

Estudi dels anticossos anticardiolipina determinats per tècnica d'E.L.I.S.A. en el lupus eritematós sistèmic

Ricard Cervera i Segura

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**ESTUDI DELS ANTICOSSOS ANTICARDIOLIPINA
DETERMINATS PER TÈCNICA D'E.L.I.S.A.
EN EL LUPUS ERITEMATÓS SISTÈMIC**

Tesi presentada per

D. Ricard CERVERA i SEGURA

per a aspirar al Grau

de Doctor en Medicina

Maig, 1987

FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA



"If you know Systemic Lupus Erythematosus,
then you know Medicine"

ROBERT G. LAHITA

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Al Dr. M. Ingelmo Morin, Cap de Servei de Medicina Interna, per la seva direcció en la realització d'aquesta Tesi Doctoral i pel constant estimul que m'ha proporcionat al llarg d'aquests anys.

Al Dr. J. Font Franco, mestre i amic, a qui vull expressar el meu sincer agraiement i profunda admiració, tant en l'aspecte científic com humà.

Al Prof. A. Urbano Márquez, Cap del Servei de Medicina Interna General i Catedràtic de Patologia General, pel seu estimul i exemple en la dedicació a la investigació biomèdica.

Al Dr. F.J. Casals del Laboratori de Cinètica Plaquetària, pels seus ensenyaments i desinteressada col.laboració en el desenvolupament de la metodologia de laboratori d'aquesta tesi.

Al Dr. R. Castillo, Cap del Servei d'Hemostàssia i Hemoteràpia, per les facilitats prestades en la utilització de les seves instal.lacions.

Al Dr. A. Bové, a la Sra. A. Guerrero i a la Srta N. Torné, per les seves inestimables col.laboracions en el treball de laboratori.

Als Drs. L. Pallarés i S. Ampurdanès, per les seves desinteressades col.laboracions en l'elaboració del material iconogràfic d'aquesta tesi.

Als companys del Servei de Medicina Interna General i molt especialment als Drs. R. Estruch, J.M. Grau, A. Coca i A. López-Soto, pels seus ajuts i encertades suggerències que han estat de gran utilitat per al desenvolupament de la present tesi.

Als companys dels diferents serveis de l'Hospital Clínic de Barcelona, per la seva desinteressada col.laboració en l'estudi dels seus malalts.

A tots els malalts, que constitueixen el material humà d'aquesta tesi.

A la Fundació Knickerbocker, per la concessió d'una beca per a la posta a punt de la tècnica d'ELISA de determinació dels anticossos anticardiolipina.

Al Fons d'Investigacions Sanitàries de la Seguretat Social (FISS), per la concessió de les beques d'Ajut a la Investigació dels anys 1986 i 1987.

A la Comissió Assessora d'Investigació Científica i Tècnica (CAICYT), per la concessió de la beca d'Ajut a la Investigació de l'any 1987.

PRINCIPALS ABREVIATURES UTILITZADES EN EL TEXT

AAC	= Anticossos anticardiolipina
AAF	= Anticossos antifosfolipid
AAN	= Anticossos antinuclears
Ac	= Anticossos
ADN	= Acid desoxiribonucleic
AL	= Anticoagulant lúpic
ARA	= "American Rheumatism Association" (Associació Americana de Reumatologia)
C	= Graus centígrads
CD4	= Limfòcits col.laboradors
CDB	= Limfòcits supressors-citotòxics
C ₃	= Factor 3 del sistema del complement
C ₄	= Factor 4 del sistema del complement
CH ₅₀	= Complement hemolític al 50 %
CIC	= Complexos immunes circulants
DE	= Desviacions estàndard
DO	= Densitat òptica
E	= Especificitat
Ef	= Eficàcia
ELISA	= "Enzyme-linked immunosorbent assay" (enzimoimmunoassaig)
ENA	= "Extractable nuclear antigen" (antigens extractables del nucli)
Fc	= Receptor de superfície Fc de la membrana cel.lular
FTA-ABS	= "Fluorescent treponemal antibody-absortion" (Prova

	d'immunofluorescència indirecta de serologia luètica)
g	= Força gravitacional
HLA	= Sistema major d'histocompatibilitat
IC	= Intèrval de confiança
Ig	= Immunoglobulina
IU	= Index d'unió
KAPS	= "Kingston Anti-Phospholipid Study" (estudi multicèntric dels anticossos antifosfolípid)
LES	= Lupus eritematós sistèmic
NK	= "Natural killer" (limfòcits assassins o lítics naturals)
n.s.	= No significativa
NZB	= "New Zeland Black" (ratolí negre de Nova Zelanda)
NZW	= "New Zeland White" (ratolí blanc de Nova Zelanda)
NZBW/F ₁	= "New Zeland Black and White" (ratolí híbrid de Nova Zelanda)
OMS	= Organització Mundial de la Salut
OR	= "Odds ratio" (raó de raons)
PAIg	= "Platelet associated immunoglobulin" (immunoglobulina adherida a la superfície plaquetària)
PGI ₂	= Prostaciclina
PTI	= Púrpura trombocitopènica idiopàtica
RR	= Risc relatiu
RIA	= Radioimmunoassaig
RNP	= Ribonucleoproteïna
RPR	= "Rapid plasma reagin" (prova reagínica de serologia luètica)

S	= Sensibilitat
SLFP	= Serologia luètica falsament positiva
SMF	= Sistema mononuclear fagocític
SNC	= Sistema nerviós central
TC	= Temps de caolí
TCE	= Temps de caolí modificat per Exner
TITD	= Temps d'inhibició de la tromboplastina tissular diluïda
TP	= Temps de protrombina
TR	= Temps de recalcificació
TTP	= Temps de tromboplastina parcial
TTPA	= Temps de tromboplastina parcial activat
TVERD	= Temps del verí d'ercurgó de Russell diluït
TXA _e	= Tromboxà
VDRL	= "Venereal disease reference laboratory" (Prova reagínica de serologia luètica)
VP+	= Valor de predicció positiva
VP-	= Valor de predicció negativa
VSG	= Velocitat de sedimentació globular

INDEX

I. MOTIVACIÓ GENERAL	1
II. MOTIVACIÓ PERSONAL	5
III. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA	7
3.1. RECULL HISTÒRIC DEL L.E.S.	7
3.1.1. Antecedents històrics	7
3.1.2. Concepte actual	10
3.2. ETIOPATOGÈNIA DEL L.E.S.	14
3.2.1. Factors etiològics	14
3.2.1.1. Factors genètics	14
3.2.1.1.1. Raga	14
3.2.1.1.2. Sistema d'histocompati-	
bilitat	15
3.2.1.1.3. Estudi familiar	16
3.2.1.1.4. Dèficits immunitaris	
hereditaris associats ..	18
3.2.1.2. Factors hormonals	19
3.2.1.2.1. Hormones sexuals	19
3.2.1.2.2. Hormones tímiques	20
3.2.1.3. Factors ambientals	21
3.2.1.3.1. Virus	21
3.2.1.3.2. Raigs ultraviolats	24
3.2.1.3.3. Fàrmacs	24
3.2.2. Alteracions immunològiques	25
3.2.2.1. Immunitat humoral. Autoanticossos .	25
3.2.2.1.1. Anticossos antinuclears.	26

3.2.2.1.2. Anticossos antimembrana cel.lular	29
3.2.2.1.3. Anticossos antifosfolípids	29
3.2.2.2. Immunitat cel.lular	29
3.2.2.3. Sistema mononuclear fagocític	30
3.2.3. Mecanismes patogènics	31
3.3. LES ALTERACIONS IMMUNOLÒGIQUES COM A MARCADORS D'ACTIVITAT LÚPICA	36
3.4. ALTERACIONS DE L'HEMOSTÀSSIA AL L.E.S.	41
3.4.1. Alteracions de l'endoteli vascular	42
3.4.2. Alteracions de les plaquetes	46
3.4.2.1. Trombocitopènia	46
3.4.2.2. Defectes plaquetaris qualitatiu ..	48
3.4.3. Alteracions de la coagulació	50
3.4.3.1. Coagulació intravascular disseminada	51
3.4.3.2. Anticoagulants antifactorials o inactivadors	53
3.4.3.3. Anticoagulants d'interferència	54
3.5. ANTICOSSOS ANTIFOSFOLÍPIDS	54
3.5.1. Anticoagulant lúpic	55
3.5.1.1. Antecedents històrics	55
3.5.1.2. Propietats fisicoquímiques i immunològiques	58
3.5.1.3. Mètodes de detecció	60
3.5.2. Anticossos anticardiolipina	65
3.5.2.1. Antecedents històrics	65

3.5.2.2. Propietats fisicoquímiques i immunològiques 68

3.5.2.3. Mètodes de detecció 72

3.5.3. Mecanisme d'acció 74

3.5.4. Manifestacions clíniques 78

 3.5.4.1. Trombosis 78

 3.5.4.2. Avortaments de repetició 80

 3.5.4.3. Trombocitopènia 81

 3.5.4.4. Afecció dels sistema nerviós central 83

 3.5.4.5. Altres manifestacions clíniques ... 85

3.5.5. Perspectives terapèutiques 85

IV. OBJECTIUS DE LA TESI DOCTORAL 87

V. MATERIAL I MÈTODE 89

 5.1. SELECCIÓ DELS MALALTS 89

 5.1.1. Grup de malalts amb L.E.S. 89

 5.1.1.1. Característiques generals 89

 5.1.1.2. Subgrups clínico-biològics 93

 5.1.1.2.1. Malalts amb trombosis .. 93

 5.1.1.2.2. Malaltes amb antecedents d'avortaments 94

 5.1.1.2.3. Malalts amb trombocitopènia 95

 5.1.1.2.4. Malalts amb afecció del sistema nerviós central 95

 5.1.1.2.5. Malalts amb altres manifestacions clínico-biològiques 96

5.1.2. Grup control de malalts amb altres	
patologies autoimmunes	97
5.1.2.1. Esclerosi sistèmica progressiva ...	97
5.1.2.2. Dermatomiositis-polimiositis	97
5.1.2.3. Artritis reumatoïde	98
5.1.2.4. Arteritis de Horton	98
5.1.2.5. Cirrosi biliar primària	98
5.1.2.6. Púrpura trombocitopènica idiopàtica	99
5.1.3. Grup control de persones sanes	99
5.2. MÈTODES DE LABORATORI	99
5.2.1. Anticossos anticardiolipina	99
5.2.1.1. Fixació de la cardiolipina	101
5.2.1.2. Bloqueig de les unions	
inespecífiques	101
5.2.1.3. Unió amb el sèrum problema	102
5.2.1.4. Unió amb el primer anticòs	102
5.2.1.5. Unió amb el segon anticòs	102
5.2.1.6. Unió amb el substracte	103
5.2.1.7. Lectura de les densitats òptiques .	103
5.2.2. Anticoagulant lúpic	103
5.2.3. Serologia luètica	106
5.2.4. Anticossos anti-ADN nadiu	106
5.2.5. Anticossos anti-ENA	107
5.2.6. Factors del complement	108
5.2.7. Altres determinacions	108
5.3. MÈTODES ESTADÍSTICS	109
5.3.1. Sensibilitat, especificitat, valors de	

predicció, eficàcia, risc relatiu i raó de raons	109
5.3.2. Mitjana aritmètica i desviació estàndard ...	112
5.3.3. Comparació de caràcters qualitius	113
5.3.3.1. Anàlisi univariada	113
5.3.3.1.1. Prova de la χ^2	113
5.3.3.1.2. Prova exacta de Fisher .	114
5.3.3.2. Anàlisi multivariada. Anàlisi discriminant per passos	115
5.3.4. Intèrval de confiança	115
5.3.5. Distribucions de les variables contínues ...	116
5.3.5.1. Distribució normal	116
5.3.5.2. Distribució log-normal	117
5.3.6. Prova d'homogeneïtat de variables quantitatives. Prova no paramètrica de Mann-Whitney	117
5.3.7. Coeficient de correlació de Spearman	118
5.3.8. Suport informàtic	119
VI. RESULTATS	120
6.1. ANÀLISI CLÍNICA DE LA SÈRIE	120
6.2. ESTUDI DELS ANTICOSSOS ANTICARDIOLIPINA	123
6.2.1. Estandardització de la tècnica d'ELISA	124
6.2.1.1. Realització de la tècnica	124
6.2.1.1.1. Fixació de la cardioplipina.	124
6.2.1.1.2. Bloqueig de les unions inespecífiques	125
6.2.1.1.3. Unió amb el sèrum problema.	125

6.2.1.1.4. Unió amb el primer anticòs.	125
6.2.1.1.5. Unió amb el segon anticòs.	126
6.2.1.1.6. Unió amb el substracte ...	126
6.2.1.1.7. Lectura de les densitats òptiques	126
6.2.1.2. Assignació d'unitats als resultats ..	127
6.2.1.3. Determinació dels valors de normalitat	127
6.2.2. Incidència dels anticòsos anticardiolipina ..	129
6.2.2.1. Incidència al LES	129
6.2.2.2. Incidència a altres patologies autoimmunes	137
6.2.2.2.1. Incidència a l'esclerosi sistèmica progressiva	137
6.2.2.2.2. Incidència a la dermato- miositis-polimiositis	137
6.2.2.2.3. Incidència a l'artritis reumatoïde	137
6.2.2.2.4. Incidència a l'arteritis de Horton	139
6.2.2.2.5. Incidència a la cirrosi biliar primària	139
6.2.2.2.6. Incidència a la púrpura trombocitopènica idiopàtica	139

6.2.3. Associacions dels anticossos anticardiolipina amb manifestacions clíniques i biològiques del LES	141
6.2.3.1. Associacions amb subgrups clínico- biològics	141
6.2.3.1.1. Associació amb trombosis	141
6.2.3.1.2. Associació amb antecedents d'avortaments	144
6.2.3.1.3. Associació amb trombocitopènia	148
6.2.3.1.4. Associació amb afecció del sistema nerviós central ..	153
6.2.3.1.5. Associació amb altres subgrups clínico-biològics.	159
6.2.3.1.6. Associació amb activitat clínica	169
6.2.3.2. Associacions amb altres anticossos antifosfolípids	175
6.2.3.2.1. Associació amb l'anticoagulant lúpic	175
6.2.3.2.2. Associació amb la serologia luètica falsament positiva.	175
6.2.3.3. Associació amb altres marcadors immunològics	179
6.2.3.3.1. Associació amb els anticossos anti-ADN nadiu.	179

6.2.3.3.2. Associació amb els anticossos anti-ENA	182
6.2.3.3.3. Associació amb els factors del complement	182
VII. DISCUSSIÓ	184
VIII. RESUM I CONCLUSIONS	213
IX. BIBLIOGRAFIA	221
X. INDEX DE TABLES I FIGURES	279

I. MOTIVACIÓ GENERAL

Actualment es considera el lupus eritematós sistèmic (LES) com la més representativa de les malalties sistèmiques immunològiques i, al mateix temps, la més complexa i la que comporta una major gravetat (1). Tot això justifica l'abundant literatura que sobre ella existeix, si bé, malgrat tot, segueix constituint un desafiament per al metge i l'investigador.

El ràpid avançament dels coneixements sobre immunologia en general i sobre autoimmunitat en particular, conjuntament amb la possibilitat d'experimentació animal, suggereixen que el LES és una malaltia inflamàtoria multisistèmica caracteritzada per la presència de nombroses alteracions immunològiques, com són l'aparició d'una àmplia varietat d'autoanticossos i diverses alteracions de les subpoblacions limfocitàries (2-4).

La majoria de les investigacions dels últims anys han estat dirigides vers l'aclariment de diversos aspectes sobre l'etiologia, patogènia i història natural del LES. No obstant això, en moltes ocasions els resultats obtinguts han estat contradictoris i sovint sotmesos a debat.

En la patogènia de la malaltia han estat implicats diversos factors (genètics, hormonals, ambientals), els quals s'associen en grau variable i condueixen a una alteració de la immunoregulació (2,5,6). La conseqüència final és la producció d'autoanticossos i

complexos immunes circulants (CIC), els quals constitueixen els principals mecanismes lesionals (7,8).

D'entre els molts autoanticossos trobats en aquesta malaltia destaquen els diversos anticossos antinuclears (AAN), els antimembrana cel.lular (antieritròcits, antiplaquetaris, limfocitotòxics...) i els recentment descrits anticossos antifosfolípids (AAF). Aquests últims es caracteritzen per anar dirigits contra estructures fosfolipídiques cel.lulars i per reaccionar "in vitro" amb la fracció fosfolipídica del complex protrombinasa de la coagulació, produint diverses alteracions en les proves d'hemostàssia. Han estat descrits dos grups principals d'aquests anticossos: l'anticoagulant lúpic (AL) i els anticossos anticardiolípicina (AAC) (9-12).

Recentment s'ha observat que els malalts amb LES i AAF presenten una alta incidència de fenòmens trombòtics, avortaments de repetició i trombocitopènia (9,13). Tanmateix, Hughes (14) ha identificat un subgrup clínic de malalts els quals biològicament es caracteritzen per presentar AAF i absència d'AAN, mentre que clínicament pateixen trombosis recurrents, avortaments espontanis i afecció neurològica. Altres autors (15-18) han observat una correlació significativa entre els nivells d'AAF i l'activitat clínica i biològica del LES, especialment entre els AAC i els títols d'anticossos anti-ADN nadiu (Ac anti-ADNn). Això podria introduir un nou element per a millorar la monitorització de l'activitat del LES.

Fins dates molt recents, la determinació dels AAF es realitzava de forma indirecta mitjançant diverses proves de coagulació de molt diferent sensibilitat, la qual cosa obligava a utilitzar varies d'elles i dificultava el reconeixement i la caracterització d'aquests anticossos (10,19-22). Darrerament, però, han estat introduïdes tècniques per a la determinació directa dels AAF, com són el radioimmunoassaig (RIA) i l'enzimoimmunoassaig ("enzyme-linked immunosorbent assay", ELISA). La introducció del sistema ELISA com a tècnica de detecció dels AAF i, concretament, dels AAC (23,24) pot aportar molts avantatges en aquest camp d'investigació, entre els quals hi destaquen: a) medicació directa de l'anticòs capaç de reaccionar amb un antigen específic, sense la possibilitat d'interferències per altres substàncies, b) quantificació dels seus nivells, c) possibilitat de detectar els diferents isotipus (IgG, IgM o IgA), d) semblant sensibilitat que el RIA, sense l'inconvenient d'utilitzar material radioactiu, e) cost econòmic menor, f) major rapidesa de realització, amb l'avantatge addicional d'analitzar un gran nombre de casos simultàniament i g) utilització de sèrum i, per tant, possibilitat d'estudiar malalts anticoagulats.

Fins el moment actual no han estat efectuats estudis prospectius en poblacions àmplies de malalts afectes de LES determinant els AAC mitjançant la tècnica d'ELISA. En aquestes circumstàncies, la motivació que ha dut a realitzar el treball exposat en aquesta Tesi Doctoral ha estat aprofundir en el desenvolupament de la tècnica d'ELISA de detecció dels AAC, en

l'estandardització dels resultats i en la seva comparació amb diverses proves indirectes de detecció dels AAF, al temps que analitzar la correlació entre els nivells d'AAC i l'existència de fenòmens trombòtics i altres manifestacions clíniques i biològiques del LES. Tot això facilitaria en un futur realitzar un tractament capaç d'evitar les greus complicacions que les trombosis en particular i el LES en general produeixen en aquests malalts.

II. MOTIVACIÓ PERSONAL

Desde la meva incorporació al Servei de Medicina Interna General de l'Hospital Clínic de Barcelona, primer com a alumne intern a l'aleshores Càtedra de Patologia General i Propedèutica Clínica (Prof. A. Balcells Gorina) i després com a metge resident, he rebut del seu equip mèdic els coneixements bàsics que configuren la formació integral d'un metge com a internista. Durant aquests anys, els ensenyaments més rellevants que en ell he obtingut han estat fonamentalment dos: d'una banda, la inexcusable obligatorietat d'una formació completa en el camp de la Medicina Interna i, en segon lloc, la necessitat de tot internista d'aprofundir, amb esperit crític i científic, en un tema concret en relació amb la Medicina Interna.

Els meus primers anys d'assistència a la capçalera del malalt van transcórrer a la Unitat 1 (aleshores denominada Sala de Dones), de la direcció de la qual s'encarrega el Dr. M. Ingelmo, a qui vull donar testimoni del meu profund agraïment i afecte. Allí vaig prendre contacte també amb el Dr. J. Font, metge adjunt del Servei i un dels capdavanters nacionals en l'estudi de les malalties sistèmiques immunològiques, amb qui vaig iniciar una estreta col.laboració professional, tant en l'aspecte mèdic assistencial com en la investigació biomèdica. Aquesta circumstància va fer despertar en mi l'interès per una malaltia que incideix de ple en el camp de la Medicina Interna: el lupus eritematós sistèmic. Aquesta entitat, d'etiologia i patogènia

desconegudes, pot afectar a la majoria d'òrgans i aparells de l'economia humana, per la qual cosa és considerada com la més representativa de les malalties sistèmiques immunològiques.

El meu interès per aquesta malaltia es va veure potenciat gràcies a l'afany de l'actual Cap del Servei de Medicina Interna General, Prof. A. Urbano-Márquez, en aprofundir en l'estudi de la seva etiopatogènia. Tot això, juntament amb les facilitats ofertes pel Servei d'Hemoteràpia i Hemostàssia que dirigeix el Prof. R. Castillo i, en especial, pel seu Laboratori de Cinètica Plaquetària del qual és responsable el Dr. F.X. Casals, va ser el motiu final en l'elecció del tema de la present Tesi Doctoral.

La intencionalitat d'aquesta Tesi va ser aprofundir en el coneixement del lupus eritematós sistèmic en general i de les alteracions associades a la presència dels anticossos antifosfolípids que en ell es presenten en particular. Aquest estudi només es possible realitzar en base a una perfecta simbiosi entre la clínica i el laboratori. Tanmateix, de fet és també el primer pas d'una línia d'investigació que sobre els anticossos antifosfolípids es porta a terme al nostre Servei.

III. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

3.1. RECALL HISTÒRIC DEL L.E.S.

3.1.1. ANTECEDENTS HISTÒRICS

El LES és conegut des de fa més de cinc segles. No obstant això, la seva denominació ha sofert diverses variacions al llarg dels anys com a conseqüència del millor coneixement i individualització de la malaltia (25-28).

A les primeres descripcions de l'entitat, als segles XV i XVI, es feia servir el terme "lupus" (lesió semblant a una mossegada de llop) per a referir-se a unes ulceracions facials que s'extenien de forma progressiva i destructiva (Paracels, Rogerius, Manardi). L'any 1833, Bielt va individualitzar aquestes lesions cutànies d'altres de semblants (lupus tuberculós) i va crear el terme "eritema centrífug", que correspon a la forma discoïdal de la malaltia.

Gairebé vint anys després, Hebra i Cazenave van adoptar per primera vegada la denominació "lupus eritematós", al temps que van assenyalar el predomini de la malaltia al sexe femení i descriuen un cas d'afecció articular concomitant. Posteriorment, l'any 1872, Kaposi va descriure les lesions cutànies "en vespertili", característiques de l'afecció cutània de la malaltia i va indicar

la possibilitat d'afecció sistèmica greu i, en ocasions, amb un desenllaç fatal.

Més tard, Jodassohn a Viena i Osler a Baltimore, entre els anys 1895 i 1904, van descriure les complicacions viscerals de la malaltia i, al mateix temps, van assenyalar el seu caràcter crònic i la possible existència d'afecció visceral sense manifestacions cutànies.

L'any 1924, Libman i Sacks van comunicar la implicació cardíaca de la malaltia i, l'any 1932, Gross descriu unes lesions anatomopatològiques anomenades "cossos hematoxilínics" de gran interès diagnòstic.

Baehr, Klemperer i Schifrin, l'any 1935, van recollir un seguit de casos amb l'objectiu de realitzar un estudi clínic i anatomopatològic combinat. D'aquest estudi, que és la descripció més complexa del quadre clínic apareguda fins aleshores, sorgeix el concepte que el LES és una malaltia progressiva i greu, en ocasions mortal, que afecta fonamentalment a les dones en edat fèrtil. Tanmateix, a nivell dels glomèruls renals descriuen unes imatges que anomenen "en nansa de filferro", característiques de la malaltia i de notori valor pronòstic.

L'any 1941, Klemperer, Pollack i Baehr van definir el terme "malalties del col.làgen", considerant que el trastorn fonamental

d'aquestes afeccions es trobava al teixit connectiu. El LES va ser considerat com la malaltia més representativa d'aquest grup (29).

Així s'arriba a l'any 1948, quan Hargraves, Richmond i Morton descriuen l'anomenada "cèl.lula L.E." al moll de l'os dels malalts amb LES (30). És a partir d'aleshores quan apareixen successivament noves tècniques de laboratori, destacant la determinació per Friou dels AAN i dels Ac anti-ADN, les quals constitueixen un important avanç en el diagnòstic de la malaltia (31,32). També són d'un notable interès les troballes en aquests malalts durant els últims anys de molts altres autoanticossos, com són el grup dels anticossos dirigits contra els antigens extractables del nucli ("extractable nuclear antigen", ENA), els anticossos limfocitotòxics o els antifosfolípids.

Darrerament, les investigacions sobre el LES han seguit fonamentalment dues direccions: d'una banda, estudis de laboratori amb models animals, especialment amb la rata de Nova Zelanda i els seus híbrids, que presenten unes alteracions molt semblants a les del LES humà i que han permès aprofundir en la base etiopatogènica de la malaltia (33); d'altra banda, estudis clínics, biològics, immunològics i epidemiològics amb àmplies sèries de malalts que han possibilitat l'establiment d'uns criteris per al diagnòstic de la malaltia, al temps que han reconegut la gran variabilitat de la seva simptomatologia i pronòstic, la qual cosa ha conduït a una nova concepció del LES i a la descripció de diversos subgrups de malalts (34-37).

3.1.2. CONCEPTE ACTUAL

El LES és una de les malalties que presenta un nombre més elevat de problemes conceptuals (34), malgrat els avançaments assolits en el coneixement dels seus mecanismes patogènics i en diversos aspectes del diagnòstic i tractament (35). Això és fonamentalment degut al desconeixement de la seva etiologia i a la manca d'una frontera ben definida del mateix (36).

El tret més característic d'aquesta entitat és la formació de nombrosos i variats anticossos dirigits contra les pròpies cèl.lules de l'organisme i que tenen el seu origen en la disregulació del sistema immunitari, sobre el qual actuen factors genètics, hormonals i ambientals, que alteren les seves dues vessants, la humoral i la cel.lular (2,46). Alguns d'aquests autoanticossos produeixen directament una acció citotòxica o citolítica sobre les cèl.lules de l'organisme (reacció d'hipersensibilitat de tipus II) mentre que d'altres formen en el torrent circulatori complexos antigen-anticòs que, en ser dipositats als diferents òrgans i teixits, produiran les lesions inflamatòries responsables de la majoria de les manifestacions clíniques d'aquests malalts (reacció d'hipersensibilitat de tipus III)(37,38).

La classificació del LES com a malaltia del teixit connectiu pot induir a confusions. Per aquest motiu, es considera més adequada la seva definició com a desordre immunològic englobat

dintre de les malalties autoimmunes (39). Com a conseqüència de les alteracions immunològiques, les seves manifestacions clíniques són múltiples i variades, abastant un ampli espectre clínic (26,37,40-44).

No obstant això, diversos autors consideren que el LES no és una malaltia única, sinó més bé una síndrome o conjunt de varies entitats amb una etiologia, fisiopatologia i pronòstic diferents, podent-se fer diversos subgrups amb característiques pròpies (5,6,45-49). Així, alguns treballs han observat diferències en les subpoblacions limfocitàries entre diversos grups de malalts. Per exemple, els malalts amb nefropatia i/o trombocitopènia tenen un descens dels limfòcits OKT 4 i en aquests casos la malaltia sol començar abans dels 20 anys; altres malalts tenen una disminució dels OKT 8 i aquests desenvolupen la malaltia més tard i presenten una afecció multisistèmica però amb una incidència baixa de nefropatia; finalment, aquells malalts amb afecció renal i neurològica simultània solen tenir un descens d'ambdós tipus cel·lulars al mateix temps (6,50).

Un altre aspecte de gran interès és la presència de determinats anticossos que s'associen de forma característica a diferents grups de malalts lúpics. En efecte, els malalts amb anticossos antiribonucleoproteïna (Ac anti-RNP) tenen una incidència elevada de fenomen de Raynaud i miositis amb escasa o nul·la afecció renal i neurològica (51,52); aquells amb títols elevats d'anticossos anti-Sm solen tenir un curs clínic més greu i

amb predomini de fenòmens vasculítics (53); la presència d'anticossos anti-La (SS B) s'associa a un major nombre de manifestacions cutànies i escasa incidència de nefropatia (54); els anticossos antihistones solen acompanyar a quadres dde lupus medicamentós o a LES amb una prevalència alta de vasculitis cutània, anèmia, nefropatia i fenomen de Raynaud, però escasa afecció del sistema nerviós central (55,56); el lupus eritematós subagut i el LES neonatal s'associen de forma característica amb la presència d'anticossos anti-Ro (SS A) (57,58); finalment, la presència d'AAF s'associa a una major incidència de fenòmens trombòtics (9-14).

Per últim, existeixen uns altres dos models de malaltia lúpica que confirmen aquesta pluralitat de subgrups: el LES associat al déficit de diferents fraccions del complement i la denominada síndrome lúpica induïda per fàrmacs. En ambdós models intervenen de forma evident factors genètics i en l'últim, a més a més, un factor exogen (45,59).

És probable que cadascun d'aquests subgrups que poseeixen una base genètica determinada, unes anomalies de la immunoregulació pròpies, uns anticossos característics i, en ocasions, una etiologia concreta siguin individualitzats i constitueixin en un futur entitats ben diferenciades.

En conclusió, tots aquests aspectes condueixen actualment a considerar el LES com un procés autoimmune, multisistèmic,

d'etiologia desconeguda, que engloba un conjunt de subgrups de base genètica i alteracions de la immunoregulació molt diversos i que presenta unes manifestacions clíniques proteïformes i una activitat fluctuant amb freqüents remissions i exacerbacions (2,34-36,40-43,60,61).

3.2. ETIOPATOGENIA DEL L.E.S.

Un dels aspectes de les malalties autoimmunes i del LES que més s'està estudiant actualment és, sens dubte, la seva etiopatogènia. Aquesta no es coneix a bastament però s'accepta de forma majoritària que diverses circumstàncies o factors (genètics, hormonals o ambientals) poden influir o modificar el sistema immunitari propi, produint una disregulació que condueix a la formació de nombrosos autoanticossos responsables de la variada simptomatologia del LES (2,4,5,37,45,46).

3.2.1. FACTORS ETIOLÒGICS

3.2.1.1. FACTORS GENÈTICS

La influència genètica en el LES humà es pot inferir en base a la informació subministrada pels estudis duts a terme respecte a la raça, l'anàlisi del sistema d'histocompatibilitat (HLA), la incidència familiar i les associacions de déficits immunitaris hereditaris i LES.

3.2.1.1.1. RAÇA

Els estudis epidemiològics assenyalen una elevada prevalença de la malaltia entre els subjectes de raça negra, notablement

superior respecte a la blanca i en proporció menor als portoriquenys. Aquestes diferències no són atribuïbles a les condicions socioeconòmiques, sinó més bé a un diferent patrimoni genètic (62-66).

3.2.1.1.2. SISTEMA D'HISTOCOMPATIBILITAT

L'estudi del sistema HLA ha ofert resultats variables segons les diferents sèries (49,65-71). Quan es van estudiar inicialment els grups HLA A, B i C (antígens de classe I) en subjectes amb LES (2), no es va objectivar una major freqüència respecte a un grup control. Així, per exemple, l'HLA-B₈ es trobava present en el 29% dels malalts i en el 21% dels controls (2).

Altres autors han observat un predomini de certes alteracions clinicobiològiques del LES associades a diversos gens del sistema HLA. Destaca una major incidència de l'HLA-A₁ B₈ en malalts amb afecció del sistema nerviós i renal, mentre en altres malalts sense aquestes característiques la freqüència era semblant a la del grup control (72). També s'ha relacionat la presència de l'HLA-B₁₀ i HLA-A₂₄ amb una major proporció d'afecció renal i de l'HLA-B₇ amb malalts en els quals predominen les lesions cutànies del tipus discoïdal (48,73).

Recentment s'han aconseguit estudiar els antígens de la regió HLA-DR (antígens de classe II), equivalent en l'home a l'Ia dels múrids, que poden constituir els gens encarregats del

desenvolupament de la resposta immunitària (45,73,74). Ha estat comprovat que la incidència en el LES de dos tipus d'HLA, l'HLA-DR_e i l'HLA-DR₃, és estadísticament superior a la que s'observa en la població control (48,67,73,75,76). La freqüència de l'HLA-B₈ detectada en estudis epidemiològics previs a la determinació de l'HLA-DR es justifica per l'estreta associació de l'HLA-B₈ amb l'HLA-DR₃, car s'hereten de forma conjunta. Tanmateix, es troba en discussió el possible paper del sistema HLA sobre la síntesi d'autoanticossos. Ha estat citada, per exemple, la relació entre xifres elevades d'Ac anti-ADN i la presència d'HLA-DR₃, així com d'anticossos anti-Ro (SS-A) i el grup HLA-B₈ i DR₃ (48,49,65,66,75,77,78).

En conclusió, es pot afirmar que existeix una predisposició genètica que exerceix una influència permisiva en el desenvolupament del LES. No obstant això, no hi ha una única alteració genètica comuna a tots els individus amb aquesta malaltia, sinó més bé, aquestes són varies i probablement per a assolir l'expressió clínica del LES es requereix la presència de dos o més gens (48,66,75).

3.2.1.1.3. ESTUDI FAMILIAR

Malgrat que la majoria dels casos de LES són esporàdics, aproximadament entre el 5 i el 10 % dels malalts tenen familiars amb aquesta malaltia (35,48,79). Donat el seu predomini en el sexe

femení, l'associació més freqüent es dona entre germanes i entre filla i mare (64).

En aquestes famílies, l'estudi dels bessons permet sospitar que la incidència familiar de la malaltia és deguda a influències genètiques o ambientals. A favor del factor genètic són els següents fets: a) major semblança clínica de la malaltia en els bessons homozigots que en els heterozigots; b) en els bessons homozigots la freqüència del LES és del 50-70 %, mentre que en els heterozigots és semblant a la d'altres membres de la família; c) el quadre clínic apareix en dates i ambients diferents i sovint existeixen altres anomalies hereditàries ja conegudes (79,80). Per contra, donen suport al factor ambiental els següents fets: a) l'aparició de la malaltia o de certs estigmes d'autoimmunitat (AAN, hipergammaglobulinèmia, anticossos limfocitotòxics, AAF) en familiars o persones amb les quals conviuen (79-82); b) existeix una relació temporal en l'inici del LES en els germans homozigots (83).

Els resultats obtinguts amb els bessons homozigots donen suport a la hipòtesi que l'agregació familiar del LES és deguda a factors genètics, més que a factors ambientals (79), si bé aquests també es troben presents i no s'han de desestimar (83).

3.2.1.1.4. DÈFICITS IMMUNITARIS HEREDITARIS ASSOCIATS

Dèficit d'IgA: Els dèficits d'IgA són freqüents en el curs del LES. Es pot tractar d'un dèficit adquirit, que es soluciona amb la correcció de les anomalies autoimmunitàries, o bé hereditari, que podria afavorir el desenvolupament del LES (40,42).

Dèficit congènit dels factors del complement: L'herència de certs dèficits de factors del sistema del complement és freqüentment de tipus autosòmic dominant (84,85). Varies d'aquestes alteracions han estat associades al LES (84). Destaca sobretot el dèficit de C_2 , el qual es presenta aproximadament en el 6 % dels malalts amb LES (86).

Segons alguns autors, el dèficit dels factors del complement pot ser un dels majors predisponents per al desenvolupament del LES, si bé el mecanisme patogènic pel qual això succeeix no es coneix en l'actualitat (83). La hipòtesi més suggestiva considera que el dèficit dels factors del complement permet la persistència d'un agent infecciós (virus ?) o de CIC que estimularien de forma permanent el sistema immunitari, amb la conseqüent síntesi d'autoanticossos i el desenvolupament del LES (85,87). Una altra hipòtesi fa referència al control de la síntesi de les proteïnes del complement pels gens del sistema HLA. La seva alteració també podria afectar els gens que regulen la resposta immunitària i ocasionar una disregulació de la mateixa, la qual conduiria a un

augment de la síntesi d'autoanticossos i, com a conseqüència, al desenvolupament del LES (35).

3.2.1.2. FACTORS HORMONALS

3.2.1.2.1. HORMONES SEXUALS

El paper que tenen les hormones sexuals, fonamentalment els estrògens, en el LES es pot inferir per la preponderància del sexe femení en aquesta malaltia. Diversos treballs experimentals amb rates han demostrat amb certesa que les hormones sexuals modulen la malaltia lúpica. Un fet destacat en el LES humà és que la freqüència de dones afectes en edat fèrtil és molt superior a la dels homes. La relació sol oscilar entre 8-11:1, segons les sèries (40,42,88). Aquest fet s'atribueix al paper patogènic important dels estrògens i es basa en les següents consideracions: 1) disminució del predomini del sexe femení a les èpoques en què no existeixen uns nivells d'estrògens elevats, és a dir, a l'edat prepuberal i al LES d'inici tardà; en aquestes situacions la relació dona-home es situa al voltant de 3:1 (40,41,89); 2) ha estat descrit que els anticonceptius orals afavoreixen el desenvolupament del LES o el poden agreujar (88,90); 3) l'embarç empitjora la simptomatologia quan la malalta es troba en fase activa de la malaltia (91,92); i 4) els malalts amb la síndrome de Klinefelter (genotip XXY) tenen una alta incidència de LES (93). En aquesta síndrome es produeix una acció hiperestrogènica per

acumulació de metabòlits actius de l'estradiol. Totes aquestes dades donen suport al paper dels estrògens en la patogènia del LES humà.

Els treballs experimentals dirigits a identificar el factor hormonal en la xarxa etiopatogènica del LES es van iniciar amb l'observació que els malalts amb la síndrome de Klinefelter i LES associat presentaven una estimulació estrogènica crònica per augment dels nivells sanguinis d'estradiol (93). Aquests resultats van suggerir que els malalts lúpics d'ambdós sexes podien trobar-se sota una situació d'hiperestrogenisme produït per alteracions del metabòlit d'aquesta hormona (94). Això sembla confirmar-se per les experiències de Lahita et al. (95) que demostren la hidroxilació anòmala de l'estradiol a nivell de C-16 en els malalts lúpics, donant com a resultat l'acumulació de metabòlits amb un grau elevat d'activitat estrogènica.

L'estudi dels nivells de les hormones sexuals als homes amb LES ha demostrat l'existència, en la majoria dels casos, de xifres elevades d'estrògens en sang i baixes d'andrògens (96,97).

3.2.1.2.2. HORMONES TÍMIQUES

Les hormones tímiques són un grup de polipèptids circulants que tenen un paper important en el manteniment de la immunitat cel·lular (98). També s'atribueixen a aquestes hormones la

inducció de la capacitat de resposta enfront a mitògens i la intervenció en la immunitat antitumoral (99).

En persones joves afectes de LES s'han observat uns nivells anormalment baixos d'hormones tímiques. No obstant això, les seves variacions en relació amb l'activitat clínica de la malaltia fan sospitar que no es tracta d'un fet irreversible en el lupus humà. També ha estat trobada una relació significativa entre uns nivells sanguinis baixos d'aquestes hormones i la gravetat de la nefropatia, sense que aquells valors es modifiquin amb el tractament (100). Aquest descens de les hormones tímiques pot intervenir en les alteracions dels mecanismes de la immunoregulació, el qual sembla ser el fet fonamental en la fisiopatogènia del LES.

3.2.1.3. FACTORS AMBIENTALS

Un altre tipus de factors implicats en l'etiologia del LES són els ambientals, d'entre els quals destaquen els virus, els raigs ultraviolats i els fàrmacs.

3.2.1.3.1. VIRUS

El fet que determinats virus ocasionessin en l'animal d'experimentació una glomerulonefritis per immunocomplexos i que

induïssin la síntesi d'AAN, ha estat l'estímul essencial en la investigació sobre possibles implicacions dels virus en l'etiologia del LES, tot i que ja fa molts anys que existeix aquesta sospita en base a l'analogia entre les manifestacions observades en el LES i les de determinades malalties víriques cròniques.

Els estudis virològics han apuntat cap a un agent, el virus ARN de tipus C. Aquest virus està constituït per diverses proteïnes, tres de les quals són d'especial interès: la p30, que constitueix l'estructura base; la gp70, glicoproteïna que forma l'embolcall del virus; i la transcriptasa inversa, enzim que permet la transcripció de la informació genètica de l'àcid ribonuclèic (ARN) a l'ADN (101). Aquests virus són endògens (integrats al genoma) i es troben àmpliament distribuïts en el regne animal. Els productes solubles d'aquests virus, com les partícules p30 i gp70, poden ser detectats en sang i teixits de diferents soques de rates, algunes d'elles tolerants amb aquests productes, mentre que d'altres, com la NZBW/F, fan anticossos contra ells (102). Per això, a nivell experimental, els estudis sobre aquest tema s'han fet bàsicament amb aquesta soca de rates.

Els mecanismes que podrien implicar el virus en l'etiologia del LES d'aquesta soca de rates podrien ser els següents: 1) síntesi d'anticossos contra les diferents proteïnes víriques, amb la conseqüent formació de CIC i posterior lesió histica (103); 2) desenvolupament d'anticossos contra antigens constituïts per gp70

presentes a la superfície cel·lular, que destruirien aquesta i provocarien la sortida de material responsable de respostes autoimmunitàries; 3) actuació com a coadjuvants; 4) lesió de l'epiteli tímic que ocasionaria un desequilibri immunoregulator; etc (64).

L'evidència de l'etiologia vírica en el LES humà és menys convincent i els resultats obtinguts al respecte són, ara com ara, contradictoris (104). S'han utilitzat diverses tècniques per tal d'aïllar i caracteritzar l'hipotètic virus implicat en el LES humà. En estudis serològics s'ha descrit la presència d'anticossos limfocitotòxics en familiars no consanguinis de malalts amb LES i en personal de laboratori en contacte amb sèrums de malalts lúpics (48,81,82,105) o, fins i tot, en propietaris de gossos amb lupus caní (106). En el sèrum de malalts lúpics s'han trobat títols elevats d'interferó, especialment de tipus alfa, relacionat amb l'activitat de la malaltia i, com es conegut, els virus estimulen la síntesi d'aquest tipus d'interferó. Són dades serològiques sense traducció clínica, però suggereixen una possible transmissió infecciosa, tot i que no existeixen resultats suficients a favor del reconeixement d'un virus en el LES. Els pocs casos identificats s'han atribuït a contaminació (107).

3.2.1.3.2. RAIGS ULTRAVIOLATS

Un altre factor ambiental que pot intervenir en l'etiologia del LES són els raigs ultraviolats procedents de la llum solar. Molts malalts lúpics tenen fotosensibilitat i l'exposició solar o el tractament amb raigs ultraviolats poden induir lesions cutànies o exacerbar la malaltia (35,108). Treballs experimentals indiquen que aproximadament el 30 % dels malalts lúpics tenen anticossos reactius contra l'ADN irradiat amb llum ultraviolada, fet que és un argument a favor de la intervenció d'aquest element en el desencadenament del LES (108).

3.2.1.3.3. FÀRMACS

També els medicaments poden induir en l'home una síndrome similar al LES ("lupus-like"), així com la formació d'autoanticossos en la rata (109). Tanmateix, hi ha diferències entre la malaltia idiopàtica i la síndrome lúpica induïda per aquests fàrmacs respecte a raça, edat, sexe, òrgans afectes i tipus d'autoanticossos (110,111).

Els millor estudiats i més coneguts són la hidracida, quinidina, hidralazina i procaïnàmid. El factor probablement més important en el desenvolupament d'aquesta síndrome lúpica és el fenotipus acetilador dels malalts. Això és particularment important en el cas de la hidralazina, la qual desencadena quadres

lúpics amb major freqüència en els individus acetiladors lents (112).

Els mecanismes pels quals aquestes substàncies poden induir la malaltia no estan ben establerts. S'ha postulat una interacció o reactivitat creuada entre aquests medicaments i els antigens nuclears, especialment l'ADN, de forma que es modificarien les seves característiques i es transformarien en autoantigens. També s'ha plantejat la possibilitat de què activin un virus o bé que actuïn a nivell de les cèl.lules T, anul.lant o disminuint les T supressores i afavorint així la síntesi d'autoanticossos per part dels limfòcits B (110,111).

3.2.2. ALTERACIONS IMMUNOLÒGIQUES

En la patogènia del LES té un paper preponderant l'alteració del sistema immunitari. Nombrosos estudis han demostrat que en aquesta malaltia la resposta immunològica tant humoral com cel.lular està alterada (2,3,113).

3.2.2.1. IMMUNITAT HUMORAL. AUTOANTICOSSOS

A nivell dels limfòcits B existeix una hiperreactivitat, la qual actualment es considera que és deguda a dos fenòmens principalment: 1) presència d'una disregulació a les subpoblacions

de limfòcits T, amb una disminució dels limfòcits supressors-citotòxics (CD8), la qual afavoreix l'acció dels limfòcits col.laboradors (CD4) sobre els limfòcits B, i 2) existència d'una hiperreactivitat pròpia dels limfòcits B. D'aquesta hiperreactivitat dels limfòcits B resulta una producció augmentada d'autoanticossos reactius en front d'autoantigens determinats (2,3,113,114). Els tres grups d'autoanticossos més estudiats en el LES són els AAN, antimembrana cel.lular i antifosfolípids.

3.2.2.1.1. ANTICOSSOS ANTINUCLEARS

Els autoanticossos més importants, al menys quantitativament, són els AAN, els quals són reactius amb diferents antigens nuclears de naturalesa diversa (ADN nadiu, ADN desnaturalitzat, diferents nucleoproteïnes, histones, etc.)(tabla 1). Els AAN es consideren com a marcadors generals de malalties autoimmunitàries però, especialment, del LES. Van ser els primers autoanticossos descrits i són els responsables de la formació de cèl.lules de Hargraves o cèl.lules L.E. Aquestes cèl.lules han estat la primera prova biològica diagnòstica del LES i continuen sent un dels criteris diagnòstics considerats per l'Associació Americana de Reumatologia ("American Rheumatism Association", ARA) (115-117).

Tabla 1.- Anticossos antinuclears

- Cèl.lules L.E.
- Anticossos anti-ADN nadiu
- Anticossos anti-ADN desnaturalitzat
- Anticossos anti-ENA
 - . Anticossos anti-Ro
 - . Anticossos anti-La
 - . Anticossos anti-Sm
 - . Anticossos anti-RNP
 - . Anticossos anti-Ma
 - . Anticossos anti-PCNA ("proliferation cell nuclear antigen")
 - . Anticossos anti-Su
- Anticossos antihistones

3.2.2.1.2. ANTICOSSOS ANTIMEMBRANA CEL·LULAR

Un altre grup d'autoanticossos força important és el dirigit contra autoantígens de membrana cel·lular. Hi han descrits anticossos antieritròcits (46), antiplaquetaris (46) i, més recentment descoberts però amb un interès creixent, antilimfocitaris o limfocitotòxics (118-120).

Aquests anticossos limfocitotòxics es trobarien dirigits contra diverses subpoblacions limfocitàries, per exemple contra els limfòcits supressors-citotòxics (CD8), i produirien les anomalies en els mecanismes de regulació immunològica pròpies dels individus lúpics. Són anticossos de naturalesa heterogènia, majoritàriament de classe IgM, que necessiten "in vitro" l'acció del complement per a produir la seva acció citolítica, la qual és màxima a temperatures baixes (4°C, 15°C, 22°C). Per això es va dubtar inicialment sobre la seva acció "in vivo", és a dir, si persistiria la seva activitat a 37°C. Posteriorment s'ha observat que poden actuar per un mecanisme anomenat citotoxicitat cel·lular dependent de l'anticòs, el qual no requereix el concurs del complement i que es realitza òptimament a 37°C. Aquest segon tipus d'anticossos limfocitotòxics són de classe IgG (118-120).

3.2.2.1.3. ANTICOSSOS ANTIFOSFOLÍPIDS

Aquests autoanticossos es caracteritzen per anar dirigits contra estructures fosfolipídiques de les membranes cel·lulars. La seva associació a alteracions de l'hemostàssia, fonamentalment a fenòmens trombòtics i trombocitopènia, ha fet créixer durant els últims anys l'interès pel seu estudi. D'ells destaquen dos grups principals, l'AL i els AAC, les característiques dels quals seran revisades a bastament en un capítol més endavant (9-14).

3.2.2.2. IMMUNITAT CEL·LULAR

Ha estat demostrat que els limfòcits T es troben selectivament disminuïts als pacients lúpics (2,3,119). Al mateix temps, diversos treballs han trobat un dèficit d'activitat supressora-citotòxica (CDB) mesurada "in vitro", especialment en la fase activa de la malaltia (3,119,121). També existeix una resposta disminuïda enfront de la fitohemaglutinina i la concavalina A, mitògens que indueixen proliferació de la població T (2,3,122).

Diferents autors (123-127) han observat en el LES una alteració de l'activitat citotòxica dels limfòcits lítics naturals ("natural killer", NK), especialment en malalts en fase activa. No és una alteració permanent sinó que pot variar en l'evolució d'un mateix individu. Es necessiten més estudis per a saber si el

descens de l'activitat dels limfòcits NK permet el desenvolupament d'una malaltia més activa o si reflecteix un estat de disregulació immunològica generalitzada. La importància d'aquestes anomalies no es coneix prou bé. El dèficit de l'activitat dels limfòcits NK pot augmentar la susceptibilitat a determinades infeccions víriques, el protagonisme de les quals en el desencadenament del LES ha estat insistentment implicat. També podria impedir la destrucció de clones de limfòcits anòmals, portadors d'antigens alterats i provocadors de la síntesi d'autoanticossos.

3.2.2.3. SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCÍTIC (SMF)

També han estat detectades en el LES alteracions del SMF (compost per macròfags, principalment esplènics, i cèl.lules de Kupffer hepàtiques) que tenen una important funció en l'eliminació dels CIC del sistema vascular (5,37,38,128-130). En l'animal d'experimentació s'ha observat que el bloqueig o saturació del SMF retarda o impedeix l'aclariment sanguini dels CIC i així es facilita el seu dipòsit al glomèrul renal (39). Al ratolí NZBW/F₁ s'ha evidenciat que, en les fases inicials de la vida, el funcionalisme del SMF és normal però que amb l'edat disminueix (131). Per això és possible que els malalts amb LES, amb manifestacions clíniques que semblen secundàries al dipòsit d'immunocomplexos, presentin una alteració a nivell del SMF que possibiliti aquest dipòsit per manca de la convenient depuració dels CIC de la sang (2,130).

En el LES humà, malgrat un aclariment aparentment normal, es pot detectar una important disfunció del SMF utilitzant hematïes autòlegues sensibilitzades amb IgG. Aquesta disfunció es relaciona amb el receptor Fc i va lligada a l'activitat de la malaltia (4,5,37,38,129-134).

3.2.3. MECANISMES PATOGENICS

L'anàlisi de tots aquests factors etiològics i alteracions immunològiques que convergeixen en el LES permet d'afirmar que, malgrat que no hi hagi resposta a nombrosos interrogants sobre la etiopatogènia d'aquesta malaltia, s'han aconseguit progressos considerables gràcies a la possibilitat d'estudiar models experimentals i al millor coneixement del sistema immunològic.

Nombrosos treballs a nivell experimental i humà assenyalen que la malaltia és multifactorial, amb una base genètica que s'associa a diversos factors endògens i exògens, diferents d'un individu a l'altre i que faciliten l'expressió del LES. Possiblement calguin més d'un d'aquests factors per tal de desenvolupar la malaltia.

En general, s'està d'acord en afirmar que, tant en el LES murí com en l'humà, existeix una activació policlonal dels limfòcits B que condueix a la producció d'autoanticossos i posteriorment a la lesió tisular. La causa inicial no es coneix

però es considera que aquesta activació dels limfòcits B està ocasionada per una anomalia pròpia dels limfòcits B i/o per una alteració dels limfòcits T supressors-citotòxics secundària a l'existència d'anticossos limfocitotòxics produïts pels propis limfòcits B.

Les vies patogenètiques són diferents segons les hipòtesis dels diversos autors. Steinberg (2), l'any 1979, va suggerir els següents factors patogènics: predisposició genètica a una estimulació excessiva dels limfòcits B (per una anomalia primària d'aquestes cèl.lules o del control que sobre elles executen els limfòcits T) i resposta excessiva genèticament determinada enfront d'antígens limfocitaris i nuclears. Aquest estadi d'hiperestimulació envers els limfòcits i els antígens nuclears permet l'expansió de les diferents clones de limfòcits B capaces de produir anticossos contra aquests antígens. Es sintetitzen preferentment anticossos limfocitotòxics i AAN, especialment anti-ADN. Aquests AAN ocasionen alteracions mitjançant la formació de CIC que produeixen lesions histiques. Els anticossos limfocitotòxics, dirigits particularment contra els limfòcits T immadurs, poden facilitar l'eliminació de limfòcits T reguladors, en especial dels T supressors-citotòxics. El resultat final és la manifestació clínica de la malaltia, hipergammaglobulinèmia, síntesi d'autoanticossos i disminució de la funció supressora, desenvolupant-se un cercle viciós. Diferents agents infecciosos poden actuar com a activadors policlonals dels limfòcits B i, en

conseqüència, ser estimul per a la producció d'anticossos limfocitotòxics i AAN.

Segons Hahn (1980) (35) en el LES succeeix una combinació de factors ambientals, genètics i hormonals (essencialment hormones sexuals) que porten a una disminució de la funció supressora i a una hiperreactivitat dels limfòcits B que, a la vegada, provoquen una producció augmentada d'autoanticossos, entre els quals es troben els limfocitotòxics, que contribueixen a la disminució de la funció supressora-citotòxica. D'aquesta forma es completa el cercle viciós i es perpetua l'activitat de la malaltia.

Meyer, Margulis i Kahn (1983) (42) han postulat que, sota la influència conjugada de factors genètics i possiblement també extrínsecs (radiació ultraviolada, virus, fàrmacs) el funcionalisme tímic està alterat i, en conseqüència, es desencadena un augment de la síntesi d'autoanticossos per manca de control dels limfòcits T sobre els B, els quals per sí mateixos ja es troben activats.

Morrow, Younou, Isenberg i Snaith (1983) (4) postulen que en el LES, tant humà com murí, hi han diverses anomalies immunològiques: hipocomplementèmia, CIC, presència d'anticossos limfocitotòxics o timocitotòxics i AAN. A nivell cel.lular existeixen anomalies en els limfòcits B, augmentades per la disminució de l'acció dels limfòcits T supressors-citotòxics a causa dels anticossos limfocitotòxics. Al mateix temps, l'acció

alterada dels limfòcits NK i macròfags amplifiquen el procés patològic.

Per últim, Tsokos (1987) (135) considera que els factors genètics, ambientals i hormonals influeixen en la producció d'anticossos pels limfòcits B. Posteriorment, alguns d'aquests anticossos poden produir un dany tisular directe, mentre que altres poden executar una retroregulació ("feed-back") sobre els limfòcits T immunoreguladors, sobre la formació de CIC o sobre l'activació del sistema del complement (fig. 1).

De tots aquests estudis es poden extreure dues conclusions fonamentals respecte a la patogènia del LES:

1.- Les reaccions immunes executen, sinò tota, sí bona part de l'expressió del LES.

2.- Existeixen factors dependents de l'individu (inclòs el sexe i la varietat genètica) i factors externs que predisposen a la iniciació i reactivació de la malaltia, sent tal vegada necessària la concurrència de més d'un d'aquests factors (136).

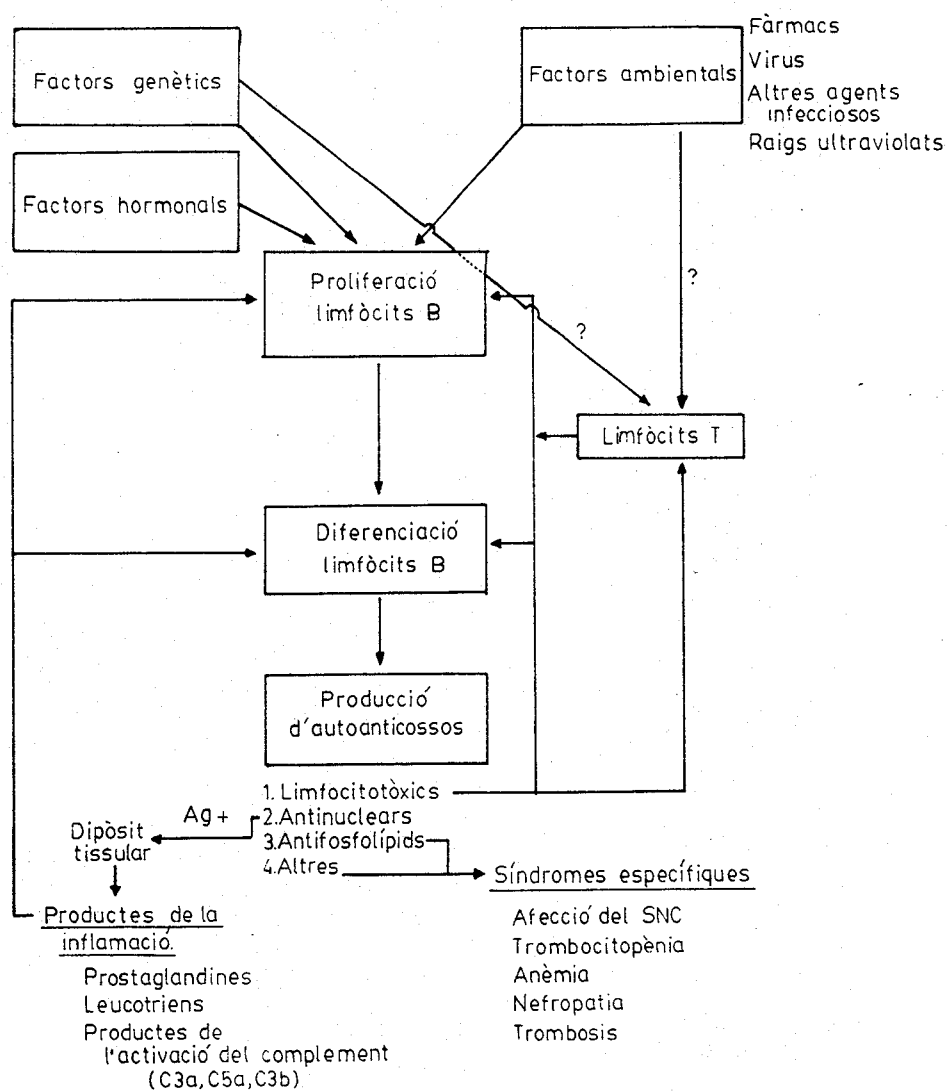


Figura 1.- Etiopatogènia del LES (modificada de Tsokos GC(135)).

3.3. LES ALTERACIONS IMMUNOLÒGIQUES COM A MARCADORS D'ACTIVITAT

LÚPICA

Algunes de les diferents alteracions immunològiques trobades al LES i que són la seva base etiopatogènica poden determinar-se al laboratori i tenir també utilitat en la detecció i el control de l'activitat clínica lúpica. No obstant això, el valor dels diversos paràmetres immunològics és un tema sotmès a debat per l'existència de resultats contradictoris. La prova de laboratori òptima ha de tenir una o més de les següents propietats: precisió en el diagnòstic d'activitat (és a dir, alt grau d'especificitat i sensibilitat), identificació de l'òrgan específic afectat i valor predictiu de recurrència de la malaltia o pronòstic. Entre les diverses proves de laboratori utilitzades en la detecció d'activitat lúpica destaquen la determinació dels Ac anti-ADN nadiu, factors del complement (C_3 , C_4 , CH-50), CIC, VSG, recompte limfocitari i plaquetari, immunoglobulines i beta-2-microglobulina. Recentment, alguns autors (16) consideren també que els AAC poden ser uns marcadors d'activitat lúpica. No obstant això, fins el moment actual no es coneix cap prova de laboratori aïllada que sigui capaç de discriminar completament entre la presència i l'absència d'activitat clínica.

Alguns autors han trobat que existeix una correlació entre l'activitat lúpica i els nivells de diversos AAN específics, com són els Ac anti-ADN nadiu i els anti-Sm. En canvi, altres autors han observat que poden existir malalts amb nivells elevats d'Ac

anti-ADN sense presentar activitat clínica. Probablement, aquestes contradiccions reflecteixen la dificultat en definir l'activitat clínica i el fet que poden ser òrgans molt diferents els que es trobin afectats. Així, Morrow et al. (144) han trobat que els Ac anti-ADN nadiu eren útils per a distingir les formes actives de les menys actives fonamentalment en els malalts amb afecció articular, renal i cutània.

Pel que respecta als factors del complement, Morrow et al. (144) van observar que el descens de C_3 i C_4 tenia molt poca utilitat per a distingir el grau d'activitat, mentre el descens del CH_{50} era un bon marcador d'activitat lúpica. També van trobar que el descens de C_3 era útil com a indicador d'afecció renal severa, mentre no ho eren el descens de C_4 ni del CH_{50} . Altres autores, en canvi, no han corroborat aquests resultats.

Els últims anys s'ha produït també força controvèrsia respecte el valor dels CIC al LES. Utilitzant tres tècniques diferents, Cairns et al. van trobar que eren bons marcadors d'activitat en els malalts amb afecció fonamentalment renal. Abrass et al. i Inman et al., en canvi, no van observar cap correlació utilitzant un assaig en fase líquida. No obstant això, Abrass et al. van objectivar una relació estadísticament significativa quan s'utilitzava un assaig en fase sòlida. Aquestes discrepàncies es poden explicar per les diferències patogèniques dels CIC, les quals són determinades pel tamany de les diferents classes dels anticossos que els componen. Morrow et al. (144),

mitjançant una tècnica de RIA en fase sòlida, van trobar que existia una correlació entre els CIC i l'activitat clínica només quan els malalts presentaven afecció articular. De forma semblant, Hay et al. havien trobat que existia una associació entre els CIC i l'afecció sinovial a l'artritis reumatoïde. Tanmateix, han estat observades marcades variacions en els nivells de CIC en resposta a diversos estímuls fisiològics, la qual cosa emfatitza la necessitat de prendre les mostres de sang sota unes condicions uniformes.

La VSG és considerada per alguns autors, com Morrow et al. (144) com a un bon marcador d'activitat, mentre Hughes et al. consideren que no ho és.

La limfopènia també és reconeguda per diversos investigadors com a un bon paràmetre per a discriminar l'afecció lúpica activa severa i moderada. Però aquest paràmetre ha de ser interpretat amb precaució perquè els malalts amb afecció lúpica severa habitualment reben tractament amb dosis elevades de corticoides i la limfopènia pot ser un fenomen iatrogènic. No obstant, Rivero et al., estudiant un grup de 158 malalts lúpics no tractats amb corticoides, van observar una correlació franca amb l'activitat de la malaltia.

En els malalts amb trombocitopènia, la xifra de plaquetes no es correlaciona amb la severitat de l'afecció lúpica en altres

òrgans, per la qual cosa es considera que el recompte plaquetari no és un bon indicador de l'estat clínic del LES.

Actualment es considera que cal la determinació combinada de diversos paràmetres immunològics per a estudiar el grau d'activitat de la malaltia. La majoria d'autors opina que els títols elevats d'Ac anti-ADN nadiu i el descens del CH_{50} són els marcadors més sensibles i específics d'activitat lúpica.

El diagnòstic de glomerulonefritis proliferativa difusa mitjançant biòpsia renal, independentment del grau de proteinúria, s'associa amb una disminució de la supervivència de 5 anys. L'elevada incidència d'infeccions en malalts amb nefropatia lúpica sembla estar relacionada amb l'administració de dosis elevades de manteniment de corticoides (més de 20 mg de prednisona diaris) i de fàrmacs immunosupressors. La nefropatia i les infeccions són les causes primàries més importants de mort en els malalts amb LES. Per tant, la utilització de marcadors biològics per a determinar l'evolució de la lesió renal i el desenvolupament d'una infecció és de la màxima importància. L'afecció del sistema nerviós central s'associa amb una elevada morbiditat però baixa mortalitat, fenomen aquest que ha esdevingut important degut a la major supervivència dels malalts amb LES (173,174). El diagnòstic i el pronòstic de l'afecció neurològica no es pot avaluar adequadament mitjançant les tècniques de laboratori actuals.

La incidència del LES sembla haver augmentat en els últims 25 anys. Malgrat això, aquesta malaltia té actualment un millor pronòstic. El reconeixement de formes benignes de LES, el tractament precoc de la nefropatia en fases inicials i l'ús dels corticoides, els fàrmacs immunosupressors i els antibiòtics són responsables en part d'aquesta milloria en el pronòstic. En canvi, els avanços en l'avaluació biològica del LES establert han arribat a un punt estacionari. El valor de les proves de laboratori es relaciona directament amb l'eficàcia dels règims terapèutics, els quals no s'han modificat de forma significativa en el decurs dels últims 10 anys. A més a més, els progressos en el camp del laboratori han de permetre clarificar els mecanismes patogènics i millorar les modalitats terapèutiques. En canvi, el diagnòstic de laboratori del LES asimptomàtic pot tenir un potencial benefici per als individus amb un elevat risc per al desenvolupament de la malaltia i aquest és un camp important d'investigació (175-199).

3.4. ALTERACIONS DE L'HEMOSTÀSSIA AL L.E.S.

L'hemostàssia és el conjunt de mecanismes fisiològics mitjançant els quals s'aconsegueix aturar els processos hemorràgics i mantenir la fluïdesa de la sang circulant. Les alteracions d'aquests mecanismes condueixen a l'aparició d'hemorràgies o de fenòmens trombòtics (200).

La presència d'alteracions de l'hemostàssia als malalts amb LES és coneguda des de la descripció de Conley i Hartmann (201) l'any 1952 de dos malalts lúpics amb fenòmens hemorràgics que presentaven un anticoagulant circulant. Durant els últims anys l'interès que inicialment van desvetllar els fenòmens hemorràgics en el LES ha capgirat vers l'estudi dels problemes trombòtics, fet que ha esdevingut patent arran del reconeixement que l'AL predispesa paradoxalment a les trombosis (9-14).

La importància clínica dels fenòmens trombòtics al LES va ser destacada originalment l'any 1980 per Gladman i Urowitz (202). Aquests autors van seguir durant set anys un grup de 180 malalts i van observar que 17 d'ells havien presentat un total de 21 episodis de trombosis venoses, algunes de les quals complicades amb tromboembolismes pulmonars. Cinc dels 17 malalts havien mort durant el període de seguiment i en tots aquests casos va ser el tromboembolisme pulmonar un factor que hi va contribuir. Aquest fet és de particular importància donada la semblança clínica que hi ha entre el dolor de la pleuritis lúpica i el tromboembolisme

pulmonar. Gladman i Urowitz van concloure que els fenòmens trombòtics es presentaven en el 9 % dels malalts amb LES i, tanmateix, eren una font important de morbiditat i mortalitat. Altres autors posteriorment han trobat unes incidències semblants i que oscil·len entre el 4.6 % a la sèrie de Dubois (203) amb 520 malalts i el 14 % a la sèrie de Moore i Lutz amb 21 (204).

Les alteracions de l'hemostàssia al LES, tant si es manifesten com a hemorràgies o com a fenòmens trombòtics, són el resultat de la interacció de tres sistemes: 1) l'endoteli vascular, 2) les plaquetes i 3) el sistema de la coagulació.

3.4.1. ALTERACIONS DE L'ENDOTELI VASCULAR

La vasculitis crònica de petits vasos és una troballa prominent al LES. La seva patogènia es considera relacionada amb el dany sobre les cèl·lules endotelials produït pels CIC o per autoanticossos com, per exemple, els AAF. Teòricament, aquesta lesió endotelial pot produir el dipòsit de fibrina i la formació de trombosis localitzades, amb la conseqüent activació local dels mecanismes fibrinolítics.

Per a provar aquesta hipòtesi, diversos investigadors han estudiat l'activitat fibrinolítica sanguínia en els malalts amb LES. Habitualment això ha estat realitzat mitjançant la quantificació dels productes de degradació de la fibrina i del

fibrinogen, amb resultats molt variables. En un d'aquests estudis, Canesi et al (205). van quantificar l'aclariment de fibrinogen al plasma de 51 malalts amb diverses malalties del teixit connectiu. Aquests autors van objectivar que l'aclariment del fibrinogen i, per tant, el seu consum es trobaven augmentats en tots els malalts, comparat amb un grup de controls. En els malalts amb LES aquest augment es correlacionava amb els nivells d'Ac anti-ADN i els factors del complement. Tanmateix, el major aclariment de fibrinogen es trobava en els malalts amb activitat clínica i nefropatia lúpica. Aquests resultats donen suport al concepte que la coagulopatia de consum és un mecanisme patogènic a les malalties del teixit connectiu.

D'altra banda, Hardin et al. (206), mitjançant la quantificació d'un dels productes de la degradació del fibrinogen, el fibrinopèptid A, van objectivar que els nivells d'aquest es trobaven elevats a tots els malalts amb activitat clínica lúpica, però, en canvi, eren normals a la majoria dels malalts en remissió. L'augment dels nivells del fibrinopèptid A es correlacionava també amb el número d'òrgans afectes, suggerint una associació directa entre l'activació de la coagulació i el grau d'activitat clínica del LES. Recents estudis de Font et al.(207) han confirmat aquestes troballes.

El paper desenvolupat pel teixit vasculític en l'activació de la coagulació i la fibrinólisi es pot demostrar més directament per la medicació de l'activitat fibrinolítica local a nivell de la

pell. Utilitzant una tècnica de determinació de l'activador del plasminogen, Dodman, Cunliffe i Roberts (208), l'any 1973, van quantificar l'activitat fibrinolítica cutània de 32 subjectes normals i 28 malalts amb vasculitis cutània. Aquesta es trobava reduïda als malalts amb vasculitis, tant a la pell afectada com a la sana. Sun et al. (209) van obtenir uns resultats similars en 12 malalts, 10 dels quals presentaven vasculitis sistèmica. Van poder demostrar també per immunofluorescència la presència d'immunoglobulines i de factors del complement als vasos de pell afectada i sana, la qual cosa suggeria el dipòsit d'immunocomplexos. Aquests autors van postular que l'activitat fibrinolítica reduïda localment era el resultat de l'augment de l'activació dels mecanismes de la coagulació i fibrinòlisi, amb la consegüent depleció local de l'activador del plasminogen a l'endoteli.

Més evidències sobre la participació dels factors endotelials en el desenvolupament dels fenòmens trombòtics en el LES són les que provenen dels estudis d'Angles-Cano, Sultan i Clauvel (210). Aquests autors van analitzar 28 malalts amb LES, cinc dels quals havien presentat fenòmens trombòtics. En tots els malalts, l'activitat fibrinolítica sanguínia era normal, inclòs el temps de lisi de l'euglobina. Setze dels 28 malalts, no obstant, no presentaven el descens esperat en el temps de lisi de l'euglobina després d'una oclusió venosa, la qual cosa suggereix una fallada de l'activador del plasminogen. Resulta interessant la troballa de que la deficiència de l'activador del plasminogen ha estat observada a d'altres malalties amb complicacions tromboembòliques,

com són la malaltia de Behçet, les trombosis venoses idiopàtiques recurrents i les vasculitis. Una altra troballa d'aquest estudi va ser que 20 dels 28 malalts amb LES tenien nivells elevats de factor VIII a la sang i que hi havia una correlació significativa entre aquest fet i l'absència de resposta a l'oclusió venosa. De forma similar, no queda clar per què els nivells augmentats de factor VIII predisposen a les trombosis, però aquest fet es troba també a d'altres situacions complicades amb tromboembolismes, com són les malalties hepàtiques, la diabetis i l'embarç. Com que el factor VIII i l'activador del plasminogen són sintetitzats per les cèl.lules endotelials, és possible que la predisposició a les trombosis sigui deguda a una alteració de l'endoteli vascular.

Els últims anys ha crescut l'interès pel paper que desenvoluparien les prostaglandines en els fenòmens trombòtics, fonamentalment la prostaciclina (PGI_2). Aquesta és sintetitzada per les cèl.lules endotelials i sembla ser el contrapunt del tromboxà (TXA_2) en la regulació de l'agregació plaquetària "in vivo". La PGI_2 és un potent inhibidor de l'agregació plaquetària i, mitjançant l'estímul constant de les plaquetes, protegeix probablement la pared vascular contra el dipòsit d'agregats plaquetaris. Aquesta substància inhibeix l'agregació plaquetària a unes concentracions més baixes de les que es necessiten per a inhibir l'adhesió plaquetària, protegint així les parets vasculars lesionades sense la formació de trombosis. Ha estat suggerida la presència d'alteracions en el balanç de la PGI_2 en els malalts amb púrpura trombocitopènica trombòtica (211), malaltia que té moltes

característiques en comú amb el LES. Així mateix, una fallada en l'alliberament de PGI_2 ha estat observada per alguns autors associada amb la presència d'AL i trombosis recurrents (212).

Finalment, Byron et al. (213) després d'estudiar recentment en 73 malalts amb LES la presència d'AL, diverses proteïnes fibrinolítiques (fibrinogen, plasminogen, antitrombina III, alfa-1-antitripsina...) i d'altres derivades de les cèl.lules endotelials (fibronectina, factor VIII, activador del fibrinogen) considera que existeixen evidències fonamentades de lesió endotelial al LES, però cap de les proteïnes fibrinolítiques estudiades es correlaciona amb la presència clínica de trombosis, mentre sí que hi ha correlació entre aquestes i l'existència d'AL. En conseqüència, els responsables de la lesió de les cèl.lules endotelials podrien ser els AAF.

3.4.2. ALTERACIONS DE LES PLAQUETES

3.4.2.1. TROMBOCITOPÈNIA

L'existència de trombocitopènia ha estat descrita en més d'un 50 % dels malalts amb LES i és la manifestació més important en aproximadament el 15 % dels casos. Habitualment és d'intensitat moderada, mentre que la trombocitopènia severa amb xifres de plaquetes inferiors a $3 \cdot 10^7$ /litre és poc freqüent (214). Es considera que la trombocitopènia és deguda a una disminució de la vida mitjana de les plaquetes com a conseqüència de l'acció

d'anticossos antiplaquetaris, de forma semblant al que succeeix en la púrpura trombocitopènica idiopàtica (PTI). No obstant això, hi han diverses incògnites respecte la naturalesa i el mecanisme d'acció d'aquests anticossos. Així, mitjançant la quantificació del factor plaquetari 3 (FP3) han estat detectats anticossos antiplaquetaris en el 80 % dels malalts amb LES i, en canvi, trombocitopènia apareix en un percentatge més baix (214). Karpatkin et al. (215) van postular l'any 1972 que en el LES existiria un estat de trombocitolisi compensada i això semblava ser confirmat per la troballa d'un temps de vida mitjana plaquetària disminuït en els pocs malalts estudiats i pel fet que s'havia trobat un increment dels megatrombòcits en la sang perifèrica dels malalts amb LES, la qual cosa suggeriria un augment de la trombopoïesi.

Aquest concepte de trombocitolisi compensada, acceptat durant molts anys, va ser rebutjat per Bergström, Olsson i Kutti l'any 1980 (216). Aquests autors van trobar al seu estudi que no hi havia diferències significatives en la vida mitjana plaquetària entre un grup control, malalts lúpics no tractats i malalts lúpics tractats, excepte si s'acompanyaven de franca trombocitopènia. A més a més, no existien diferències significatives en la producció de plaquetes entre aquests grups. Els autors van concloure que en el LES no existeix un estat de trombocitolisi compensada i també van considerar inadequada la tècnica de quantificació del FP3 per a detectar anticossos antiplaquetaris.

Durant els últims anys han estat desenvolupades tècniques més específiques de detecció d'anticossos antiplaquetaris, com la determinació de serotonina plaquetària alliberada i, fonamentalment, tècniques immunològiques de detecció d'immunoglobulines adherides a la superfície plaquetària ("platelet associated immunoglobulin", PAIg). Recents estudis de Howe i Lynch (217) han demostrat que les PAIg trobades en malalts amb LES s'uneixen a determinants antigènics plaquetaris diferents dels que s'uneixen les PAIg dels malalts amb PTI. Tanmateix, basant-se en un elegant treball, Rauch et al. (218) postulen que mentre els anticossos antiplaquetaris de la PTI van dirigits contra glicoproteïnes plaquetàries específiques, els del LES són més heterogenis i poden anar dirigits contra proteïnes, ADN o fosfolípids presents a la membrana plaquetària. Això explicaria l'associació trobada per alguns autors (9) en el LES entre trombocitopènia i nivells elevats d'Ac anti-ADN o AAF. En conseqüència, subgrups d'Ac anti-ADN i d'AAF es comportarien com a anticossos antiplaquetaris i serien els responsables de la trombocitopènia present al LES.

3.4.2.2. DEFECTES PLAQUETARIS QUALITATIUS

El funcionalisme plaquetari ha estat estudiat per nombrosos investigadors amb resultats variables. Regan, Lackner i Karpatkin (219) van estudiar 21 malalts amb LES i van trobar un descens en la resposta a l'agregació al col.làgen, adenosindifosfat (ADP) i

adrenalina en 12 (57 %). Aquesta hipoagregabilitat va ser idèntica a l'observada amb la ingesta d'aspirina, però cap d'aquells malalts no havia pres aspirina ni cap altre fàrmac conegut capaç d'alterar el funcionalisme plaquetari durant els 10 dies de la prova. L'alteració del funcionalisme plaquetari semblava correlacionar-se amb l'activitat de la malaltia, però en canvi no es correlacionava amb la presència d'anticossos antiplaquetaris. De forma interessant, quan les fraccions de les globulines dels malalts es mesclaven amb plasma normal ric en plaquetes, es va trobar un factor capaç d'inhibir l'agregació plaquetària en tres dels set malalts amb funcionalisme plaquetari anormal. Aquest factor no es va trobar al sèrum d'altres set malalts amb funcionalisme plaquetari normal. Troballes semblants han estat observades en malalts amb PTI i amb la malaltia dels dipòsits plaquetaris (220). Altres autors no han confirmat la hipoagregabilitat plaquetària al LES i a l'estudi d'Angles-Cano, Sultan i Clauvel (210) no es van observar alteracions plaquetàries funcionals en 28 malalts amb LES. Els estudis d'agregació plaquetària van ser normals i no es va observar agregació espontània. L'activitat procoagulant plaquetària va ser essencialment normal. La impossibilitat de trobar una alteració plaquetària funcional consistent pot estar relacionada amb el fet que a les proves "in vitro" s'utilitzi un estímul fisiològic erroni i resulta interessant que en la descripció de Zahavi i Marder (220) de la malaltia dels dipòsits plaquetaris, en la qual van demostrar una hipoagregabilitat plaquetària, el seu pacient presentava múltiples episodis trombòtics.

Existeix un gran nombre de mecanismes immunològics que poden intervenir en el LES i promoure l'activació plaquetària, predisposant a les trombosis. Es coneix des de fa anys que els CIC poden produir agregació plaquetària, amb l'alliberament de factors com la histamina i la serotonina (221). Els CIC també poden activar el sistema del complement, el qual, pels seus efectes sobre els basòfils i els mastòcits, promou la secreció per aquestes cèl.lules del factor activador plaquetari. A més a més, alguns dels factors del complement poden per ells mateixos activar les plaquetes directament. Les evidències de l'existència d'activació plaquetària contínua procedeixen de l'observació que en el LES les plaquetes circulants tenen reduïdes les concentracions de serotonina intracel.lular, mesurades quantitativament (222). Encara que aquest fenomen ha estat estudiat principalment associat a nefritis, l'activació plaquetària es creu que succeeix en el torrent circulatori i no "in situ" al ronyó. Ha existit un gran interès en el possible paper dels mecanismes de la coagulació en la patogènesi de la glomerulonefritis per complexos immunes i, particularment, en la participació de les plaquetes com a mitjanceres del dany cel.lular (223).

3.4.3. ALTERACIONS DE LA COAGULACIÓ

El sistema de la coagulació és l'encarregat en darrer terme de la gelificació de la sang gràcies a la conversió d'una proteïna

plasmàtica soluble, el fibrinogen, en una altra insoluble, la fibrina, la qual constitueix la base del coàgul sanguini. El pas del fibrinogen a fibrina requereix la participació d'un enzim proteolític anomenat trombina. La conversió de la protrombina en trombina té lloc mercès a l'acció d'un grup de factors, també amb activitat proteolítica, anomenat complex protrombinasa o complex activador de la protrombina, constituït pels factors X i V activats, calci i fosfolípids plaquetaris (224). L'activació del factor X s'efectua a l'organisme per dues vies o mecanismes: la via intrínseca i la via extrínseca. Tots aquests esdeveniments constitueixen l'anomenada cascada de la coagulació (fig. 2) (201). Els estudis en els malalts amb LES han detectat diverses alteracions en aquesta cascada de la coagulació que poden resumir-se en l'existència de: 1) síndrome de coagulació intravascular disseminada, 2) anticoagulants antifactorials o inactivadors, i 3) anticoagulants d'interferència. Aquest últim grup és constituït pels AAF.

3.4.3.1. COAGULACIÓ INTRAVASCULAR DISSEMINADA (C.I.D.)

La CID o coagulopatia per consum és un trastorn en el qual s'activen els mecanismes de la coagulació, es dipositen fibrina i plaquetes als vasos sanguinis i existeix una tendència a les hemorràgies. Aquesta CID, localitzada o difusa, s'atribueix als CIC i/o a substàncies similars a la tromboplastina ("thromboplastin-like") (225-231).

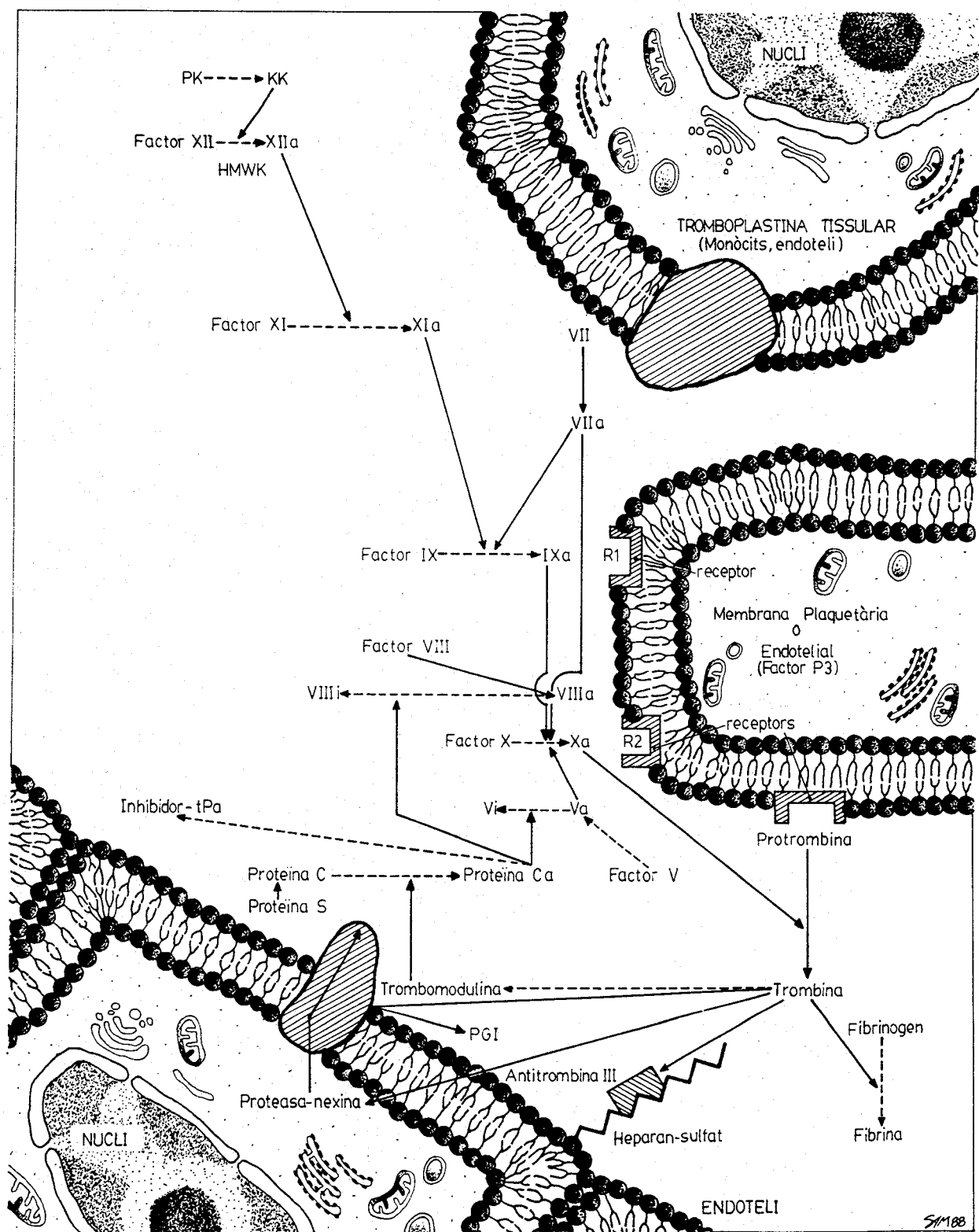


Figura 2.- Cascada de la coagulació sanguínia.

Els CIC presents al plasma dels malalts amb LES activen el sistema contacte de la coagulació i, d'altra banda, lesionen l'endoteli vascular per la seva capacitat d'activar el complement i el sistema de les cinines. La toxicitat cel.lular detectada als malalts lúpics dóna lloc a l'alliberament de substàncies similars a la tromboplastina que són capaces d'activar la via extrínseca de la coagulació sanguínia. Malgrat l'existència d'aquests dos factors, la CID és molt infreqüent als malalts amb LES (230) i tampoc ha estat demostrada la seva presència a la majoria dels malalts lúpics amb trombosis (210).

3.4.3.2. ANTICOAGULANTS ANTIFACTORIALS O INACTIVADORS

Els anticoagulants antifactorials o inactivadors són immunoglobulines plasmàtiques que actuen com a anticoagulants circulants enfront de determinats factors de la coagulació. En els malalts amb LES han estat descrits anticoagulants enfront dels factors XII, XI, IX, VIII-C, VIII-Ag i II (232-239). La seva presència ha estat detectada en alguns malalts associada a trombosis (234,235,237,239). Tot i això, aquests tipus d'anticoagulants constitueixen una raresa i, fins i tot, en àmplies sèries de malalts amb LES i trombosis no ha estat detectat cap cas (240,241), per la qual cosa alguns autors dubten de la seva existència.

3.4.3.3. ANTICOAGULANTS D'INTERFERÈNCIA

Els anticoagulants d'interferència són també immunoglobulines plasmàtiques que actuen com a anticoagulants circulants, interferint en la interacció de diversos factors entre si a nivell del complex protrombinasa. Aquest grup és constituït pels AAF (9-14).

3.5. ANTICOSSOS ANTIFOSFOLÍPIDS

D'entre els diversos autoanticossos descrits al LES, els AAF destaquen per l'interès creixent que durant els últims anys està prenent el seu estudi. Aquests autoanticossos es caracteritzen per anar dirigits contra estructures fosfolipídiques i per associar-se fonamentalment a alteracions de l'hemostàssia, com són els fenòmens trombòtics i la trombocitopènia (9-14).

En l'actualitat es reconeixen dos grups principals d'AAF: l'AL (201,214,242-245) i els AAC (246-250). Darrerament han estat aïllats altres anticossos dirigits contra fosfolípids, com els antifosfatidilserina, anti-àcid fosfatídic i antifosfatidilinositol. Tots ells tenen en comú amb els AAC el fet que van dirigits contra fosfolípids carregats negativament (251). Basant-se en la demostració de reactivitat creuada entre alguns anticossos monoclonals anti-ADN i la cardiolipina i altres fosfolípids, diversos investigadors consideren que un subgrup

d'anticossos anti-ADN s'uniria als grups fosfodièster de la cadena de l'ADN i que, per tant, aquest subgrup podria ser també un altre grup d'AAF (252-255). Aquests resultats, però, no han estat confirmats per altres equips d'investigació (9).

3.5.1. ANTICOAGULANT LÚPIC

3.5.1.1. ANTECEDENTS HISTÒRICS

La primera comunicació d'un anticoagulant circulant al LES s'atribueix a Conley i Hartmann (201), els quals van descriure l'any 1952 dos malalts lúpics que tenien un desordre hemorràgic atribuïble a una alteració de la coagulació. És probable, no obstant, que aquest anticoagulant hagués estat descrit prèviament per Aggeler et al. (256), l'any 1946, en un malalt amb púrpura trombocitopènica complicada amb trombosis. Altres autors (214,242-245) van confirmar amb les seves descripcions l'existència d'aquest anticoagulant circulant que allargava "in vitro" el temps de tromboplastina parcial activat (TTPA) i el temps de protrombina (TP). Aquest anticoagulant va ser anomenat AL per Feinstein i Rapaport (243) perquè havia estat descrit originàriament en malalts amb LES. No obstant això, posteriorment ha estat descrita la seva presència o la dels altres AAF a molt diverses patologies autoimmunes, infeccions, neoplàsies (257-258) i, fins i tot, en algun cas en persones aparentment sanes (259,260). Recentment ha estat detectada la seva existència en

malalts afectes de la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) (261)(tabla 2).

Si bé les primeres descripcions de l'AL es van fer en malalts amb hemorràgies (201), ben aviat es va comprovar que aquestes eren infreqüents en els malalts que tenien aquest anticoagulant i només apareixien si coexistien altres alteracions de l'hemostàsia com, per exemple, trombocitopènia o dèficits d'algun factor de la coagulació. Aleshores, es va considerar que potser l'AL era només un altre anticòs del LES i que no tenia cap significat clínic aparent. Recentment, però, ha hagut un ressorgiment en l'interès pel seu estudi donat que s'ha trobat una associació entre la seva presència i l'existència de trombosis, avortaments i morts fetals intrauterines i trombocitopènia (9-14).

Abans de revisar més profundament les seves característiques, cal fer esment que el terme AL és, de fet, equivoc ja que, com ha estat comentat, clínicament no acostuma a produir hemorràgies ni tampoc és específic del LES. Malgrat ser una denominació desencertada es continua utilitzant per raons històriques i amb la consideració que és un AAF que es comporta "in vitro" com a anticoagulant (allarga els temps de coagulació). Recentment, alguns autors han proposat la utilització del terme "anticoagulant semblant al lúpic" o "de tipus lúpic" ("lupus-like anticoagulant") (262,263).

Tabla 2.- Malalties on han estat detectats AAF

1.- Immunològiques

- LES
- Síndrome lúpica induïda per fàrmacs
- Síndrome similar al lupus ("lupus-like")-Síndrome antifosfolipid primària
- Esclerosi sistèmica progressiva
- Malaltia mixta del teixit connectiu
- Dermatomiositis-Polimiositis
- Malaltia de Behçet
- Síndrome de Sjögren
- Anèmia hemolítica autoimmune
- Tiroïditis de Hashimoto
- Artritis reumatoïde
- Púrpura trombocitopènica idiopàtica
- Miastènia gravis
- Vasculitis

2.- Infeccions

- Mononucleosi infecciosa
- Lepra
- Tuberculosi
- Sífilis
- Rickettsiosi
- SIDA

3.- Neoplàsies

- Mieloma múltiple
- Malaltia de Hodgkin
- Limfomes
- Carcinomes (colon, coll, pròstata...)

4.- Altres malalties

- Aterosclerosi
- Mielofibrosi
- Diabetis mellitus
- Limfedema congènit
- Condromalàcia
- Malaltia de Degos
- Malaltia de Von Willebrand
- Síndrome de Guillain-Barré

5.- Persones aparentment sanes

- Embarag
- Familiars de malalts amb LES
- Ancians

3.5.1.2. PROPIETATS FISICOQUÍMIQUES I IMMUNOLÒGIQUES

Diversos estudis han demostrat que l'AL és un anticòs. La primera referència en aquest sentit es troba en una descripció efectuada per Frick l'any 1955 (264). Aquest autor va referir el cas clínic d'una dona embarçada amb LES i AL juntament amb SLFP. Tant l'AL com la SLFP es van detectar al sèrum del seu nadó. El primer va persistir durant 3 mesos mentre la segona va romandre positiva durant 6 mesos.

Posteriorment, altres autors (242,265,266) van donar suport a aquesta hipòtesi però van ser Yin i Gaston (267) els primers que l'any 1965 van aïllar una fracció proteica IgG amb activitat anticoagulant, utilitzant una filtració amb gel i Sephadex G-200 amb purificació posterior sobre cel.lulosa DEAE. Lechner (268), utilitzant mètodes similars, va trobar activitat anticoagulant tant a la fracció IgG com a la IgM. Finalment, Thiagarajan et al. (12) van descriure l'any 1980 un anticòs monoclonal IgM amb activitat AL en un malalt amb macroglobulinèmia de Waldenström.

L'acció d'aquest anticòs es produeix "in vitro" a nivell del complex protrombinasa de la cascada de la coagulació, com es dedueix dels seus efectes a les proves rutinàries de la coagulació (267-269). En efecte, l'AL es detectava clàssicament per la prolongació del TTPA i del TP (243,264,265,270) i la normalitat del temps de trombina (TT). L'alteració del TTPA i del TP suggereix que l'AL no té efecte sobre la via intrínseca ni

extrínseca per sobre de l'activació del factor X. El TT explora la fase final de la coagulació i, per tant, la normalitat d'aquesta prova suggereix que l'AL no actua en els últims passos de la coagulació. A més a més, el TTPA alterat no es corregeix mitjançant la incubació amb un volum igual de plasma normal pobre en plaquetes, com succeeix en els casos en què hi ha un dèficit factorial. En fer la incubació amb aquest plasma normal, la inhibició és immediata i no s'incrementa progressivament amb el temps, com fan els anticoagulants que inhibeixen factors específics de la coagulació, anomenats també anticoagulants antifactorials (271,272).

El complex protrombinasa és constituït pels factors X i V activats, calci i un element fosfolipídic anomenat FP3. Recentment han estat identificats el fosfatidilinositol i la fosfatidilserina com a integrants d'aquest element fosfolipídic. Existeixen evidències indirectes, però prou importants, de què l'AL actua sobre el component fosfolipídic d'aquest complex (242,244). L'única evidència directa de què l'AL s'uneix específicament als fosfolípids prové de l'elegant treball realitzat per Thiagarajan et al.(12). Aquests autors, com ha estat comentat anteriorment, van observar que un anticòs monoclonal de l'isotipus IgM, procedent d'un malalt amb macroglobulinèmia de Waldenström, tenia activitat AL i, a més a més, presentava reactivitat creuada amb fosfolípids carregats negativament. L'efecte més intens de l'AL sobre el TP quan es dilueix la tromboplastina tissular, que és un

extracte fosfolipídic, és també una evidència indirecta que suggereix activitat antifosfolipídica (264,265,270).

Alguns autors (244,273,274) han demostrat que incrementant la concentració de fosfolípid es pot corregir parcialment l'efecte de l'AL. Tanmateix, els estudis de Firkin et al.(275) han demostrat que tant les plaquetes normals com les plaquetes activades i les plaquetes lisades poden corregir els efectes de l'AL. Això suggereix que el fosfolípid o fosfolípids contra els quals va dirigit es troben presents a la membrana plaquetària. Posteriorment, altres autors han confirmat aquestes troballes (276,277).

3.5.1.3. MÈTODES DE DETECCIÓ

La detecció de l'AL es realitza mitjançant les proves coagulomètriques dependents de fosfolípids, però existeixen també altres tècniques per a augmentar la seva especificitat, com són la incubació amb plasma normal, la neutralització amb plaquetes i les tècniques immunològiques.

A.- PROVES COAGULOMÈTRQUES DEPENDENTS DE FOSFOLÍPIDS: Donat que l'AL inhibeix "in vitro" l'activació de la protrombina per la seva acció sobre el component fosfolipídic del complex protrombinasa, per a la seva detecció al laboratori es fan servir aquelles tècniques coagulomètriques en les quals participen

fosfolípids en la seva realització. La presència de l'AL farà que s'allarguin els seus temps normals de coagulació (278-281). Aquestes són les anomenades proves coagulomètriques dependents de fosfolípids (200) i les més freqüentment utilitzades són les següents:

- Temps de tromboplastina parcial (TTP) o temps de cefalina:

Explora la via intrínseca i és el temps que tarda en coagular un plasma al qual s'afegeixen fosfolípids (cefalina, anomenada també tromboplastina parcial) i calci (procés de recalificació). Per a la realització de totes aquestes tècniques cal fer que el plasma sigui pobre en plaquetes, mitjançant la centrifugació, per tal que hi hagi la mínima quantitat possible de fosfolípids plaquetaris (200).

- Temps de tromboplastina parcial activat (TTPA) o temps de cefalina activat o temps de cefalina-caolí: és una variant de l'anterior per a l'exploració de la via intrínseca. Per a la seva realització, abans d'afegir al plasma cefalina i calci, s'afegeix caolí que actua com a sistema contacte (200).

- Temps de protrombina (TP): Explora la via extrínseca i és el temps que tarda en coagular un plasma al qual s'afegeixen tromboplastina tissular i calci. La tromboplastina tissular pot ser de diversos orígens, però les més utilitzades són la humana i la de cervell de conill, també anomenada simplastina (200).

- Temps d'inhibició de la tromboplastina tissular diluïda (TITD): és una variant de l'anterior per a l'exploració de la via extrínseca. En aquesta prova es fa servir la tromboplastina tissular de cervell de conill (simplastina), la qual es dilueix en sèrum salí fins a aconseguir unes concentracions de 1:50 o 1:500 (259).

- Temps de veri d'escurçó de Russell diluït (TVERD): Té la particularitat d'utilitzar veri d'escurçó de Russell diluït (1:200) com a sistema contacte. Es medeix el temps que tarda en coagular un plasma al qual s'afegeixen veri d'escurçó de Russell diluït, fosfolípids (trombofax) i calci (20).

- Temps de recal·cificació (TR): Aquesta és una tècnica en la qual no s'afegeix cap fosfolípid per a la seva realització sinó que s'aprofiten els fosfolípids plaquetaris que en petita quantitat romanen al plasma malgrat la centrifugació. Es medeix el temps que tarda en coagular un plasma al qual s'afegeix només calci (200).

- Temps de caolí (TC): és una variant de l'anterior en la qual s'afegeix caolí com a contacte i calci (276).

- Temps de caolí modificat d'Exner (TCE): és una modificació del TC introduïda per Exner. Consisteix en mesclar plasma del malalt i control en diferents proporcions i realitzar el TC. S'assumeix que hi ha un AL quan la corba que resulta a la gràfica

"dilucions-TC" és convexa a la regió que correspon a la zona de petita proporció de plasma problema (276).

B.- PROVA D'INCUBACIÓ AMB PLASMA NORMAL: La detecció d'un allargament en els temps de coagulació determinats per les tècniques abans descrites indueix a sospitar l'existència d'AL. No obstant això, cal, a més a més, descartar l'existència de déficits factorials i d'anticoagulants antifactorials. Per a això cal procedir a la incubació del plasma patològic amb plasma normal (1:1). En fer aquesta incubació i repetir la prova alterada, si hi ha AL es produeix també l'allargament del temps de coagulació de forma immediata (242,243).

Paradoxalment, en alguns casos aquest allargament és més prolongat que abans de fer la incubació amb plasma normal. A aquest peculiar fenomen se l'anomena efecte cofactor de l'AL (267,276,281,282). En l'actualitat, no se sap ben bé quin tipus de substància o quina alteració aporta el plasma normal. Loeliger (282) creu que podria ser protrombina, Yin i Gaston (267) una immunoglobulina, Rivard et al. (281) consideren que és una molècula diferent d'aquestes dues però amb propietats semblants a elles i Exner et al. (276) suggereixen que es tracti de petites quantitats de trombina generades en el plasma control. En canvi, tots els autors estan d'acord en què no es tracta ni de factors del complement ni de la resta dels factors de la coagulació (259,276).

Si en lloc d'AL, el que hi ha al plasma patològic és un déficit factorial, no es produeix l'allargament del temps de coagulació en fer la incubació i si hi han anticoagulants antifactorials, només es produirà aquest allargament si la incubació amb plasma normal és prolongada.

C.- PROVA DE NEUTRALITZACIÓ AMB PLAQUETES: Consisteix en afegir plaquetes rentades a un plasma en el qual s'ha trobat un allargament de les proves coagulomètriques dependents de fosfolípids. Si la causa d'aquest allargament és la presència d'AL, en afegir les plaquetes es normalitzarà el temps de coagulació (20).

D.- TÈCNiques IMMUNOLÒGiques: Consisteixen en detectar per mètodes immunològics (immunodifusió, RIA, ELISA) la presència d'anticossos dirigits contra fosfolípids (tromboplastina tissular, fosfatidilserina, àcid fosfatídic, fosfatidilinositol). Tenen com a principal problema la complexitat de la seva realització per la qual cosa només estan a l'abast d'alguns laboratoris d'investigació (20,23,24).

3.5.2. ANTICOSSOS ANTICARDIOLIPINA

3.5.2.1. ANTECEDENTS HISTÒRICS

És probable que la primera comunicació indirecta d'AAC fos la descripció efectuada per Wasserman l'any 1906 d'una "reagina" present al sèrum dels malalts luètics, la qual reaccionava amb un extracte salí de fetge de fetus amb sífilis congènita. Durant les tres dècades següents es va comprovar que els extractes alcohòlics d'una gran varietat de teixits normals eren també bones fonts de material antigènic. D'aquesta forma es van desenvolupar diverses tècniques de fixació del complement i de flocculació per a detectar aquesta "reagina" (283,284). L'any 1941, Pangborn (246) va demostrar que l'antigen aïllat d'extractes alcohòlics de múscul cardíac de bou era un fosfolípid que va ser anomenat posteriorment cardiolipina. L'estudi de l'estructura de la cardiolipina va demostrar que es tractava d'un difosfatidilglicerol amb un grup lliure beta-hidroxil al mig i els grups fosfatidil a les posicions gamma (fig. 3)(285,286). La situació dels àcids grassos es va determinar mitjançant la identificació dels fragments obtinguts per hidròlisi de la cardiolipina amb àcid acètic calent (287). Cardiolipina pura, mesclada amb quantitats acuradament ajustades de lecitina i colesterol com a agents sensibilitzants, es va utilitzar posteriorment per a la realització de les proves de fixació del complement i de flocculació per a detectar la "reagina", la qual, per tant, estaria constituïda per AAC (283).

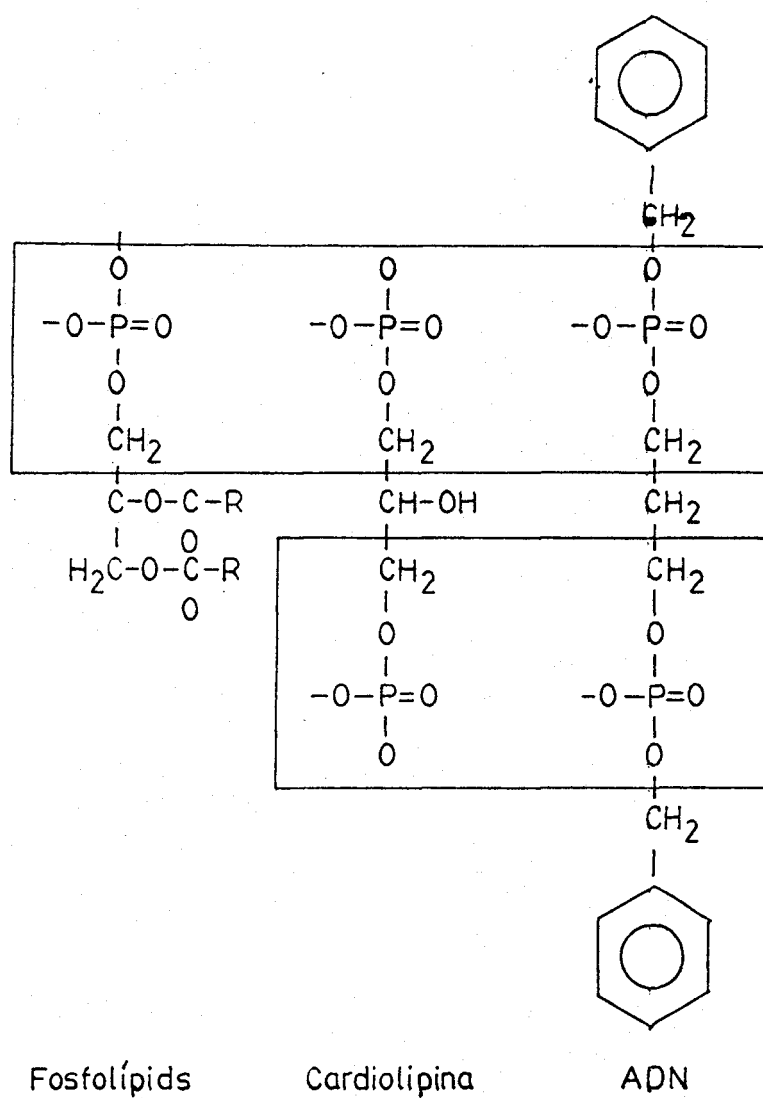


Figura 3.- Estructura comparada de la cardiolipina.

Com a resultat dels amplis estudis amb personal militar i civil realitzats durant la Segona Guerra Mundial, es va comprovar que un gran nombre d'individus presentava una d'aquestes proves positives sense evidència clínica de patir la sífilis (288). El desenvolupament per Nelson et al. (289,290) l'any 1949 de la prova d'immobilització dels treponemes va permetre una millor diferenciació entre els malalts amb una prova verdaderament positiva per a la sífilis i aquells altres amb una serologia luètica falsament positiva (SLFP). Moor i Mohr (288) van trobar que hi havien dos grups de reactors falsament positius: aquells amb proves falsament positives transitòriament (generalment degudes a una infecció intercurrent) i un segon grup en el qual aquestes proves romanien positives de forma persistent. Aquest últim grup va ser anomenat com a fals positiu biològic crònic i hi inclou aquells individus sense evidència clínica o epidemiològica de sífilis que presenten repetidament serologia luètica reagínica positiva i determinacions negatives de la prova d'immobilització dels treponemes, durant més de 6 mesos.

L'any 1955, Moor i Lutz (204) van observar que els malalts amb una SLFP crònica i, per tant, amb AAC presentaven una alta incidència de malalties autoimmunes, fonamentalment LES, síndrome de Sjögren, anèmia hemolítica autoimmune, tiroïditis de Hashimoto i artritis reumatoïde. Diversos estudis prospectius realitzats posteriorment van demostrar que una SLFP crònica podia precedir en uns quants anys diverses malalties autoimmunes, sobre tot el LES (283,291-295).

Durant molts anys es va considerar que la presència d'aquests AAC era només un marcador més del LES i de les altres malalties autoimmunes. Recentment, però, s'ha produït un ressorgiment en el seu interès perquè diversos investigadors han trobat, igual que en el cas de l'AL, una associació entre la seva presència i l'existència de fenòmens trombòtics, avortaments i morts fetals intrauterines i trombocitopènia (9-14). Això ha motivat també que es perfeccionessin diverses tècniques immunològiques més específiques per a la seva detecció (23,24).

3.5.2.2. PROPIETATS FISCOQUÍMIQUES I IMMUNOLÒGIQUES

Mitjançant estudis fisicoquímics i immunològics s'ha demostrat que la "reagina" de la SLFP i els AAC són immunoglobulines dels isotipus IgG, IgM o IgA (296-299). Els AAC obtinguts d'animals o de malalts luètics reaccionen al mateix temps que amb la cardiolipina amb diversos altres fosfolípids, fenomen anomenat reactivitat creuada (297,298,300-307). Degut a aquesta considerable reactivitat creuada dels AAC existeixen encara molts interrogants sobre l'especificitat d'aquests anticossos.

Els estudis inicials, mitjançant tècniques de flocculació i de fixació del complement, utilitzaven cardiolipina i altres fosfolípids mesclats amb concentracions variables de lecitina i colesterol. Per tant, els resultats d'aquests primers estudis

s'han d'interpretar amb precaució. Tanmateix, els AAC detectats en malalts luètics poden ser diferents dels anticossos presents als individus amb SLFP (305). Dos grups d'investigadors han trobat que els AAC obtinguts en animals o en malalts sifilítics reaccionen millor amb la molècula de cardiolipina intacta (248,306). Existia una disminució de la reactivitat dels AAC després de treure un àcid fosfatídic de la molècula o el grup hidroxil central o escurçant o allargant la distància entre els grups fosfodièster. La cardiolipina perdia la seva antigenicitat si els grups glicèrid de la molècula eren substituïts per grups benzil (248) o si es treien més de dos àcids grassos de la molècula (306). Aquests investigadors conclouien que els anticossos s'unien a un a o ambdós grups fosfodièster de la molècula de cardiolipina, però les porcions glicèrid de la molècula eren essencials per a la seva reactivitat. De Siervo (302), en un estudi posterior, va suggerir que la immunització amb cardiolipina podia resultar d'una mescla d'anticossos que reaccionessin amb tota la molècula de cardiolipina o amb diferents porcions d'ella.

Més intrigants van ser els resultats del treball de Guarnieri (303), el qual va demostrar que els AAC i antifosfatidilinositol reaccionaven també amb l'ADN i en una petita proporció amb l'ARN, però aquesta reactivitat creuada es produïa només quan l'ADN o l'ARN estava mesclat amb lípids auxiliars, com són la lecitina i el colesterol. Aquest investigador explicava aquesta reactivitat creuada basant-se en la semblança entre la regió polar antigènica de la cardiolipina i la porció amb unions fosfodièster de l'ADN.

Recentment s'ha trobat que els anticossos monoclonals anti-ADN obtinguts d'hibridomes murins (252,255) i humans (253) tenen reactivitat creuada amb la cardiolipina. Els AAC monoclonals murins també reaccionen amb l'ADN (18). Aquest estudi va ser completat per Koike et al. (308) els quals van descriure reaccions creuades entre els Ac anti-ADN desnaturalitzat i, amb menor quantitat, els Ac anti-ADN nadiu de malalts amb LES amb cardiolipina. En un estudi posterior (254), van descriure reactivitat creuada dels AAC en malalts lúpics amb ADN desnaturalitzat i ADN nadiu. Tincani et al. (309) també han descrit una forta correlació estadística entre els AAC i la positivitat del Ac anti-ADN desnaturalitzat però no entre els AAC i la dels Ac anti-ADN nadiu.

Alguns grups, en canvi, no han confirmat aquestes troballes. Morgan et al. (310) han descrit que els hibridomes dels Ac-anti-ADN nadiu i Ac anti-ADN desnaturalitzat monoclonals no eren inhibits per cardiolipina ni per altres fosfolípids. Harris et al. (249) no han trobat cap correlació entre els nivells d'AAC i els d'Ac anti-ADN nadiu mitjançant anàlisi de regressió. En un estudi de 10 malalts amb LES i nivells elevats d'AAC van trobar que la cardiolipina i altres fosfolípids carregats negativament inhibien l'activitat dels AAC, però, en canvi, no existia una inhibició significativa de l'activitat dels AAC per l'ADN nadiu ni l'ADN desnaturalitzat. Posteriorment, també van trobar que la cardiolipina no inhibia l'activitat dels Ac anti-ADN en altres 10 malalts amb LES estudiats (250). Existeixen, en canvi, diverses

comunicacions en les quals s'han trobat malalts amb AAN negatius però amb nivells elevats d'AAC i AL. És probable que un petit subgrup d'AAC tinguin reactivitat creuada amb ADN. No obstant això, diversos estudis suggereixen que els AAC reaccionen de forma creuada primer amb fosfolípids carregats negativament com la fosfatidilserina, l'àcid fosfatídic i el fosfatidilinositol.

Sembla també clar que els anticossos responsables de la SLFP són diferents dels presents en els malalts luètics. Dóna suport a aquesta hipòtesi el fet que la SLFP normalment és positiva només a títols baixos, mentre que els malalts luètics no tractats presenten títols molt elevats (311). Per altra banda, algunes troballes preliminars utilitzant RIA en fase sòlida per a detectar AAC mostren que el sèrum sifilític dóna resultats positius baixos o negatius però que els individus amb SLFP i altres amb serologia luètica negativa presenten títols elevats d'AAC (250). Basant-se en aquests resultats, és probable que l'epítop de la molècula de cardiolípin, quan aquesta es mescla amb lecitina i colesterol en fer les proves estàndard de la sífilis, sigui diferent del de la cardiolípin que s'uneix a la superfície plàstica del RIA en fase sòlida.

La cardiolípin es localitza a la part interna de la membrana mitocondrial, i Wright et al. (312) han observat que el sèrum de luètics dóna un patró d'immunofluorescència antimitocondrial diferent del que s'observa a la cirrosi biliar primària. Estudis posteriors han detectat que els AAC en malalts amb patologia

sistèmica immunològica, alguns dels quals amb AL, tenen un altre patró d'immunofluorescència (M5) diferent del que presenten els malalts amb sífilis (M1) (313). La detecció de l'activitat AL en malalts amb SLFP però no en malalts luètics suggereix també diferències entre aquests grups d'AAC (314). Existeixen possiblement també variacions en les especificitats dels AAC fins i tot en el grup de malalts amb SLFP (305).

3.5.2.3. MÈTODES DE DETECCIÓ

La detecció dels AAC es realitzava clàssicament de forma indirecta, mitjançant les proves reagíniques de determinació de la serologia luètica. No obstant això, els últims anys s'han desenvolupat diverses tècniques immunològiques més específiques per a la seva detecció (RIA, ELISA).

A.- PROVES REAGÍNIQUES DE SEROLOGIA LUÈTICA: Les més utilitzades són les tècniques de flocculació ("venereal disease reference laboratory", VDRL), d'aglutinació ("rapid plasma reagin", RPR) i de fixació del complement (reacció de Wasserman). Totes elles utilitzen cardiolípinia mesclada amb lecitina i colesterol com a agents sensibilitzants. La positivitat d'aquestes proves, juntament amb la negativitat de les proves treponèmiques (tècniques d'immobilització dels treponemes de Nelson i d'immunofluorescència indirecta o FTA-ABS, "fluorescent treponemal

antibody-absorption") s'anomena SLFP i constitueix una forma indirecta de detectar els AAC (315).

B.- TÈCNiques IMMUNOLÒGIQUES:

- RIA: Permet detectar la presència al sèrum d'anticossos dirigits contra cardiolipina pura. Bàsicament, aquesta tècnica consisteix en fixar cardiolipina a una placa i afegir posteriorment el sèrum problema. Si existeixen al sèrum AAC, aquests es fixaran amb la cardiolipina i la resta del sèrum s'extraurà mitjançant rentats. La detecció dels complexos cardiolipina-AAC es fa afegint una immunoglobulina antiimmunoglobulina humana marcada radioactivament. La quantitat de radioactivitat detectada serà proporcional a la quantitat d'AAC presents al sèrum problema (249).

- ELISA: és una variant de l'anterior en la qual en lloc d'una immunoglobulina marcada radioactivament es fa servir una altra marcada amb un enzim, habitualment fosfatasa alcalina. En afegir un substracte com el nitrofenilfosfat, l'enzim l'hidrolitzarà i donarà lloc a una substància colorejada. La intensitat del color detectada serà proporcional a la quantitat d'AAC presents al sèrum problema (23,24).

3.5.3. MECANISME D'ACCIÓ

Malgrat l'activitat anticoagulant "in vitro" dels AAF, clínicament s'associen fonamentalment a la presència de fenòmens trombòtics (9-14). Aquesta associació ha estat demostrada estadísticament però la possible relació causa-efecte podria ser de dos tipus: a) els AAF serien els causants, directa o indirectament, dels fenòmens trombòtics, o b) els AAF serien la conseqüència dels fenòmens trombòtics. En el primer cas, els AAF serien agents patogènics, mentre que en el segon serien només marcadors de trombosi. A hores d'ara, no existeixen encara suficients evidències experimentals que donin suport a una o altra possibilitat.

Les raons per a la manca de protecció enfront de les trombosis dels malalts amb AAF són diverses però només especulatives. La majoria de les hipòtesis consideren l'existència d'alteracions de les propietats antitrombòtiques bàsiques de les cèl.lules endotelials i es fonamenten en estudis "in vitro". Carreras et al. (213) van descriure en un malalt amb trombosis arterials i AAF la presència d'una gammaglobulina que inhibia la síntesi de prostaciclina per part de les cèl.lules endotelials de bou cultivades. Per tant, les trombosis podien ser degudes a una disminució del control de l'agregació plaquetària. Altres autors van observar que la producció de prostaciclina no era inhibida per tots els plasmes amb AAF, probablement degut a l'heterogeneïtat

dels AAF o a que aquests AAF no eren realment els responsables de la inhibició de la síntesi de prostaciclina (316).

Angles-Cano et al. (210) han trobat una reducció o absència de la capacitat fibrinolítica a la majoria d'una sèrie de malalts amb LES, la meitat dels quals presentaven AAF. La inhibició del sistema fibrinolític podria estar en part relacionada amb la modulació efectuada per la proteïna C. Aquesta és una proteïna vitamina-K-dependent que es pot convertir en una proteasa (proteïna C activada) per l'acció de la trombina, si aquesta es troba en presència d'un cofactor essencial de la membrana de la cèl.lula endotelial anomenat trombomodulina (complex trombina-trombomodulina) (317). La proteïna C activada exerceix la seva activitat anticoagulant mitjançant la degradació dels factors V i VIII activats (318), en presència d'un fosfolípid i d'un altre cofactor, la proteïna S, la qual és també vitamina-K-dependent (319).

Els malalts amb un dèficit qualitatiu o quantitatiu de proteïnes C o S, amb l'activitat d'aquestes reduïda per sota del 50-60 % de la normalitat, tenen un risc augmentat de presentar episodis tromboembòlics recurrents (320,321).

Dos grups diferents d'investigadors (322,323) han objectivat una inhibició de la trombomodulina solubilitzada o unida a les cèl.lules endotelials per fraccions IgG procedents de malalts amb AAF. També ha estat observat que la reconstitució de la

trombomodulina de placenta humana purificada (324) o de pulmó de conill (325) formant vesícules de fosfolípids és la responsable d'un increment significatiu en la velocitat d'activació de la proteïna C pel complex trombina-trombomodulina. La cardiolipina sembla tenir uns efectes similars (324). Ha estat demostrada també l'existència d'una immunoglobulina IgM amb activitat AL que neutralitza aquest efecte incrementador del fosfolípid sobre l'activitat de la trombomodulina purificada (326).

Si bé els fosfolípids semblen estar involucrats en la regulació cel.lular tant dels mecanismes coagulatius com dels anticoagulants, la inhibició de la seva activitat pels AAF té "in vitro" un efecte anticoagulant i "in vivo" un efecte predominantment trombogènic. Aquests fets suggereixen que la neutralització dels fosfolípids en la via de la proteïna C ha de ser considerada com a una de les possibles causes de les trombosis associades amb els AAF (261).

En un estudi recent (327), s'ha observat que 5 de 13 malalts amb AL presentaven un dèficit parcial de proteïna S. No obstant, aquest fet és sorprenent i una explicació possible seria la dificultat que comporta la quantificació de la proteïna S plasmàtica, donat que circula tant en forma lliure com formant un complex amb una proteïna unida a la fracció C_{4b} del complement (321). La proteïna S només té activitat en la via de la proteïna C en forma lliure.

En el LES i en altres malalties autoimmunitàries, es considera que existeix una producció d'autoanticossos per a 30.000-55.000 molècules de trombomodulina presents a la superfície de la cèl.lula endotelial (328). La detecció d'aquests autoanticossos seria possible amb tècniques sensibles d'"immunoblotting". En el cas de la disminució de l'activació de la proteïna C, el sistema fibrinolític pot estar també afectat donat que la proteïna C activada ha estat demostrat que estimula l'activitat fibrinolítica de les cèl.lules endotelials cultivades, mitjançant la disminució de l'activitat de l'inhibidor del plasminògen tissular (329,330).

Els AAF o els CIC podrien reaccionar directament amb fosfolípids de les membranes de les cèl.lules endotelials o plaquetàries i alterar el funcionalisme d'aquestes cèl.lules, predisposant així els malalts a les trombosis. Aquest mecanisme podria ser el responsable de la trombocitopènia associada als AAF, que seria deguda a l'agregació plaquetària (316).

Una altra hipòtesi atractiva és que aquests malalts podrien desenvolupar autoanticossos antiidiotípus (antiAAF). Aquests anticossos antiidiotípus podrien imitar la imatge interna de l'autoantigen i tenir una estructura semblant als fosfolípids procoagulants, podent així catalitzar les reaccions de la coagulació sanguínia (316).

3.5.4. MANIFESTACIONS CLÍNIQUES

Els fenòmens trombòtics, que poden afectar qualsevol territori vascular, i els avortaments i les morts fetals per trombosis dels vasos placentaris o fetals, són les manifestacions clíniques més freqüentment associades amb els AAF i on les possibles relacions etiopatogèniques han estat més estudiades, com s'ha descrit al capítol anterior. No obstant això, diversos autors han relacionat també els AAF amb altres manifestacions clíniques, com trombocitopènia, afecció del sistema nerviós central, etc., al temps que han adduït les seves hipotètiques relacions etiopatogèniques.

3.5.4.1. TROMBOSIS

Els primers estudis sobre l'AL feien èmfasi en la seva associació amb fenòmens hemorràgics (201,264,265,270). No obstant això, es va comprovar aviat que no existia un augment del risc d'hemorràgia en els malalts amb aquest factor, fins i tot en aquells malalts sotmesos a intervencions quirúrgiques (242,257,259,266,331). A més a més, quan presentaven hemorràgies, aquestes es podien atribuir a la seva associació amb trombocitopènia (232,242,259,331) o amb altres dèficits de factors de la coagulació, fonamentalment hipoprotrombinèmia (242,269,271,282). Paradoxalment, l'AL, que s'associa a la prolongació dels temps de coagulació "in vitro", sembla associar-

se a la presència de fenòmens trombòtics arterials o venosos "in vivo". Aquesta associació entre l'AL i les trombosis ha estat trobada per molt diversos investigadors (210,232,241,258,314,331-335), destacant les àmplies sèries de Boey et al.(241), que troben una història de fenòmens trombòtics en 18 de 31 malalts amb AL, i les de Elias i Eldor (331) que en troben 19 de 35 malalts amb AL.

També ha estat descrita l'associació entre SLFP, presència d'AL i existència de fenòmens trombòtics. Johansson i Lassus (314) van estudiar 96 malalts amb SLFP i van trobar que 36 d'ells presentaven AL i 8 d'aquests tenien trombosis de repetició. Aquests mateixos autors, en un treball posterior, van descriure 8 malalts amb SLFP i AL que presentaven trombosis venoses recurrents a les extremitats inferiors i púrpura necrotitzant ulcerada, la biòpsia cutània de la qual mostrava proliferació dels capilars dèrmics sense signes inflamatoris (336).

Harris et al.(249), utilitzant una tècnica de RIA en fase sòlida, van estudiar una sèrie de 65 malalts amb LES i altres malalties autoimmunes i van trobar un augment dels AAC en 15 de 18 malalts amb història de trombosis venoses o arterials. Tanmateix, van observar correlació estadística entre els nivells dels AAC i les trombosis. Setze dels 18 malalts amb trombosis presentaven també AL. En un estudi prospectiu (337), de 15 casos amb malalties autoimmunes i infarts cerebrals, 13 presentaven augment dels AAC de l'isotipus IgG. En els últims anys, molts altres autors han descrit en els seus treballs l'associació entre la presència d'AAF

i l'existència de fenòmens trombòtics, tant arterials com venosos i que poden afectar qualsevol territori vascular, predominantment en persones joves. Així han estat referides trombosis venoses a les extremitats, de vegades complicades amb tromboembolismes i hipertensió pulmonar (338-344), a les venes renals (345), caves, hepàtiques, suprahepàtiques (malaltia venooclusiva, síndrome de Budd-Chiari)(316,346,347), retinianes (348), etc. Pel que respecta a les trombosis arterials, s'han descrit a les coronàries (àngor, infart de miocardi)(316,345,349), cerebrals (accidents isquèmics transitoris, accidents vasculars cerebrals, demència multiinfàrtica)(350), axil.lars (351), artèries de les extremitats (úlceres, púrpura necrotitzant, gangrena)(352), mesentèriques (infart intestinal)(353), retinianes (348), renals (nefropatia, hipertensió arterial)(11), etc.

3.5.4.2. AVORTAMENTS DE REPETICIÓ

Els AAF apareixen també associats amb l'existència d'avortaments i de morts fetals intrauterines de repetició (354-361). Hughes et al.(9) van estudiar 21 malaltes amb morts fetals intrauterines de repetició i van trobar en 16 d'elles l'existència d'AL i/o nivells elevats d'AAC. Diversos estudis (356,359) han confirmat aquestes troballes i han observat que les morts intrauterines es produeixen habitualment en el segon o tercer trimestre de la gestació. Moltes d'aquestes malaltes no tenen un LES establert i sovint es presenten només amb morts fetals

intrauterines i escasos símptomes o signes s'afecció immunològica que no arriben a definir cap malaltia concreta (356,359,362).

Carreras et al.(213,334) han descrit que l'AL inhibeix la producció de prostaciclina per part del miometri humà gestant. Aquests autors postulen que la prostaciclina podria desenvolupar un important paper en la regulació de la circulació fetal i, per tant, un dèficit en la seva producció per part dels vasos placentaris podria produir una disminució del flux sanguini, formació d'infarts placentaris i, consegüentment, patiment fetal. Les troballes de Hughes et al.(9) d'infarts placentaris múltiples en els estudis anatomopatològics de placentes procedents de fetus avortats de malaltes amb LES i AL i/o AAC donen suport a aquesta hipòtesi. Altres investigadors consideren que la mort fetal també podria produir-se per l'aparició de trombosis al propi fetus (360).

3.5.4.3. TROMBOCITOPÈNIA

Diversos estudis (232,241,257,271) han mostrat associació entre l'AL i la trombocitopènia al LES i, tanmateix, alguns treballs recents (249,363) suggereixen també l'associació entre els AAC i trombocitopènia. En un estudi de 116 malalts amb LES i altres malalties immunològiques es van trobar uns nivells elevats d'AAC del serotipus IgG en 30 de 43 malalts amb trombocitopènia (363). Existia també una forta correlació significativa entre els nivells elevats d'AAC IgG i trombocitopènia ($p < 0.001$) i dels 20

malalts amb els nivells més alts d'AAC IgG 16 tenien trombocitopènia. En un altre estudi, de 96 malalts amb PTI, es van trobar nivells elevats d'AAC dels serotipus IgG i/o IgM en 30 casos (364).

Basant-se en aquestes observacions, sembla suggeridora la hipòtesi que els AAF es podrien unir als fosfolípids de la membrana plaquetària i produir un augment de la captació de les plaquetes pel SMF i la seva destrucció subsegüent. Així, resulten interessants les troballes de Hughes et al.(9) en el sentit que les plaquetes trencades per sonicació inhibeixen en el laboratori la unió dels AAC a la cardiolipina.

L'anàlisi dels fosfolípids de la membrana plaquetària suggereix que els fosfolípids carregats negativament es troben localitzats primàriament en la part interna o endoplasmàtica de la membrana (305). Diversos autors han demostrat que tant l'AL com els AAC reaccionen millor amb aquests fosfolípids carregats negativament (9). Així, la ruptura de la membrana plaquetària per sonicació podria produir l'exposició dels fosfolípids carregats negativament i explicar la inhibició de la unió dels AAC. És també possible que l'activació de les plaquetes pogués exposar els fosfolípids carregats negativament de la seva membrana i produir com a conseqüència un augment de la unió dels AAF a la plaqueta. La necessitat d'activació de les plaquetes prèviament a la unió dels AAF pot ajudar a explicar per què no tots els malalts amb AAF desenvolupen trombocitopènia (9).

3.5.4.4. AFECCIÓ DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

A més a més de l'afecció sobre el sistema nerviós central produïda per les trombosis de les arteries cerebrals (accidents isquèmics transitoris, accidents vasculars cerebrals, demència multiinfàrtica)(350), resulta també possible que els AAF es puguin unir directament al teixit cerebral i estar implicats en la patogènia d'aquesta manera d'alguna de les manifestacions neurològiques del LES i d'altres malalties immunològiques. En un treball prospectiu de malalts amb SLFP, Catterall (283) va trobar sis dones que havien desenvolupat una mielopatia transversa similar a l'esclerosi múltiple. Degut a que aquestes malalties presentaven alguns trets de LES, Catterall va denominar aquesta síndrome "esclerosi lupoïdal". En un estudi posterior d'aquestes sis dones, Fulford et al.(365) van suggerir que l'esclerosi lupoïdal podria ser una variant del LES caracteritzada per la presència de símptomes neurològics crònics i signes suggestius d'esclerosi múltiple amb alteracions biològiques que inclouen una elevació de la VSG, AAN positius, presència de cèl.lules LE i SLFP. Aquesta síndrome és semblant, en alguns aspectes, a un altre procés descrit a Jamaica i a d'altres illes del Carib, anomenat neuropatia jamaicana, les característiques de la qual inclouen la presència de mielopatia transversa, defectes de cordons posteriors, atròfia òptica i alteracions a nivell del vuitè parell cranial (366). Diversos malalts amb neuropatia jamaicana presenten SLFP. Hughes et al. (9) han trobat recentment un malalt amb mielopatia transversa que tenia AAN positius, Ac anti-ADN normals

i AAC de tipus IgM elevats. Altres manifestacions neurològiques presents al LES i on s'ha descrit la seva associació amb la presència d'AAF són la migranya, epilepsia, corea, síndrome de Guillain-Barré i neuritis òptica (367).

Encara que pot ser temptadora la hipòtesi que els AAF podrien representar un paper patogènic a l'esclerosi múltiple, Catterall (283) no va trobar cap SLFP en un estudi fet a 69 malalts amb aquesta malaltia. D'altra banda, Harris et al. no han trobat una incidència estadísticament significativa de nivells alts d'AAC en els sèrums de 94 malalts amb esclerosi múltiple.

Diversos estudis (368-371) han demostrat l'existència d'anticossos que reaccionen amb teixit nerviós en malalts amb afecció neurològica lúpica. Alguns d'aquests anticossos són limfocitotòxics, presumiblement perquè reaccionen de forma creuada amb determinants antigènics presents simultàniament a les membranes limfocitàries i neuronals. Així, s'ha demostrat l'existència d'anticossos antiglicolípid que presenten reaccions creuades amb les membranes dels limfòcits T i de les neurones en malalts amb afecció neurològica lúpica (372). També s'han trobat fosfolípids tant a les membranes limfocitàries com neuronals. Tanmateix, en dos estudis diferents (373,374) s'ha observat que uns nivells alts d'AAC poden unir-se a membranes neuronals en models animals. D'aquesta forma es pot pensar que existeix una sub població d'anticossos limfocitotòxics que són AAF.

3.5.4.5. ALTRES MANIFESTACIONS CLÍNiques

Si bé en un número reduït de casos, ha estat descrita la presència d'AAF en malalts amb lïvedo reticularis i síndrome de Sneddon (375,376), anèmia hemolítica (354), lesions valvulars cardïaques (377), hipertensió arterial (354,378), toxèmia gravídica (354), endometriosi (379) i una síndrome post-part caracteritzada per l'associació de febre, pneumonitis, pleuritis, infarts pulmonars i miocarditis (380).

3.5.5. PERSPECTIVES TERAPÈUTiques

Diversos investigadors (242,259,266,331,333,381,382) han observat una disminució en l'activitat de l'AL amb corticosteroides i/o immunosupressors. Tanmateix, alguns estudis preliminars (9) han suggerit que la plasmaferesi juntament amb prednisona i/o altres immunosupressors poden disminuir tant l'activitat de l'AL com els nivells d'AAC. Va resultar de particular importància, l'estudi de Lubbe et al.(359) en el qual van descriure 6 dones amb LES i avortaments de repetició, totes elles amb AL. El tractament d'aquestes dones amb 50 milígrams diaris de prednisona i aspirina va produir la desaparició de l'activitat de l'AL i va permetre embarços a terme satisfactoris. Diversos treballs posteriors han confirmat aquests bons resultats amb sèries més àmplies de malalts (335,378,383).

El tractament dels malalts amb AAF es basa en la premissa que aquests desenvolupen un paper etiopatogènic en la trombosi, trombocitopènia i avortaments de repetició. No obstant això, cal tenir en compte que no tots els malalts amb AAF tenen aquestes complicacions. Actualment es considera que probablement no està justificat el tractament dels malalts amb AAF però sense manifestacions clíniques actives, excepte en el cas de les dones embaraçades amb AAF i antecedents d'avortaments. Tanmateix, donada la morbiditat i mortalitat potencial de la recurrència d'accidents vasculars cerebrals o trombosis venoses amb tromboembolismes pulmonars, sembla estar indicat un esforç per a eliminar els AAF en els malalts que han presentat prèviament algun d'aquests episodis. El problema rau en el fet de determinar quin és el tractament més idoni en aquests casos (9). El paper dels antiagregants plaquetaris i dels anticoagulants orals en la prevenció de les trombosis recurrents en malalts amb AAF és incert (258,259,333,384-426). L'experiència de diversos grups d'investigació sembla demostrar que alguns malalts continuen presentant trombosis de repetició malgrat una adequada teràpia anticoagulant. Es troba actualment en curs un estudi prospectiu multicèntric internacional, en el qual participa l'Hospital Clínic de Barcelona, destinat a avaluar les diverses pautes terapèutiques ("Kingston Anti-Phospholipid Study", KAPS) (427). A hores d'ara, no obstant, es recomana la utilització conjunta d'anticoagulants o antiagregants plaquetaris més fàrmacs immunosupressors, com els corticoides, en tots aquells malalts amb història de trombosis i presència d'AAF (9).

IV. OBJECTIUS DE LA TESI DOCTORAL

La recent introducció del sistema ELISA com a tècnica de detecció dels AAC ha posat de manifest la importància d'aquests anticossos i la seva estreta relació amb fenòmens trombòtics, avortaments de repetició, trombocitopènia i altres manifestacions clíniques i biològiques del LES. No obstant això, fins el moment actual no han estat efectuades de forma prospectiva determinacions d'AAC mitjançant aquesta tècnica a poblacions àmplies de malalts lúpics i persisteixen encara moltes incògnites respecte a la seva metodologia de realització i valoració dels resultats, així com sobre la seva incidència i relació amb l'existència de diverses manifestacions del LES. Tanmateix, alguns autors suggereixen que els AAC podrien constituir un marcador d'activitat lúpica i la seva determinació contribuiria a un millor control de la malaltia.

Amb la base de les hipòtesis i observacions anteriors, els objectius de la present Tesi Doctoral van ser:

1. Desenvolupar la tècnica d'ELISA de detecció dels AAC, assignar als resultats unes unitats de càlcul senzill i determinar els valors de normalitat.

2. Conèixer la incidència dels AAC en una sèrie de 100 malalts amb LES i la seva relació amb la presència de fenòmens trombòtics, avortaments de repetició, trombocitopènia i altres

manifestacions clíniques i biològiques del LES, amb la finalitat de comprovar si defineixen algun subgrup clínic.

3. Valorar l'interès dels AAC com a paràmetre d'activitat clínica del LES.

4. Comparar la presència dels AAC amb la de l'AL i la SLFP.

V. MATERIAL I MÈTODE

5.1. SELECCIÓ DELS MALALTS

5.1.1. GRUP DE MALALTS AMB L.E.S.

5.1.1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

Han estat estudiats de forma prospectiva durant 2 anys (1986-87) 100 malalts diagnosticats de LES en base als criteris de l'ARA, modificats l'any 1982 (149)(tabla 3).

L'obtenció de dades per a l'estudi es va portar a terme aplicant un protocol clínico-biològic, realitzat per la mateixa persona que incloïa:

1. Anamnesi:

- Antecedents familiars: Amb referència especial a l'existència de membres afectes de malalties sistèmiques immunològiques.

- Antecedents personals: Hàbits tòxics, embarços, morts fetals intrauterines i avortaments, anticonceptius orals, immunitzacions passives prèvies o transfusions sanguínies.

- Antecedents patològics: Malalties anteriors, simptomatologia inicial i en el moment del diagnòstic, evolució clínica i terapèutica del LES.

Tabla 3.- Criteris diagnòstics del LES (ARA, 1982)

1. Eritema facial
2. Lupus discoïdal
3. Fotosensibilitat
4. Ulceres orals
5. Artritis no erosiva
6. Proteïnúria superior a 0,5 gr/dia o presència de cilindres cel.lulars o hemàtics
7. Convulsions o psicosi
8. Pleuritis o pericarditis
9. Anèmia hemolítica o trombocitopènia (<100.000 plaquetes/ mm^3) o leucopènia (<4.000 leucòcits/ mm^3) o limfopènia (<1.500 limfòcits/ mm^3) en dues o més determinacions
10. Anticossos anti-ADN nadiu o anti-Sm o cèl.lules L.E. o SLFP
11. AAN positius

- Malaltia actual: Simptomatologia clínica actual a diferents nivells:

- . General: Febre, astènia, anorèxia, pèrdua de pes.
- . Aparell locomotor: Artràlgies, artritis, nòduls subcutanis, miàlgies.
- . Cutani-mucós: Eritema en vespertili, hiperpigmentació, lesions mucoses, púrpura, urticària, erupció cutània inespecífica, alopecia, gangrena de zones distals, lesions discoïdals.
- . Renal: Hipertensió arterial, edema, hematúria.
- . Cardio-vascular: Fenòmens trombòtics, dolor toràcic, insuficiència cardíaca, palpitations, fenomen de Raynaud.
- . Respiratori: Dolor pleurític, dispnea, expectoració, tos.
- . Hematològic: Púrpura, síndrome anèmica, colúria, dolor lumbar, adenopaties.
- . Neurològic: Trastorns de la conducta o de la marxa, epilepsia, neuràlgies, cefalea, diplopia.
- . Gastro-intestinal: Disfàgia, dolor abdominal, icterícia, ascites.

2. Exploració Física:

Inspecció general, constants vitals i examen sistemàtic per aparells, a la recerca d'alteracions pròpies del LES i trombosis.

3. Exploracions complementàries:

- Radiografia de tòrax: En projecció postero-anterior i lateral.

- Radiografia de tòrax: En projecció postero-anterior i lateral.

- Electrocardiograma

- Biologia general: VSG, hemograma, glicèmia, ionograma, BUN i creatinina en plasma i orina, proteïnes totals i proteïnograma, transaminases, gamma-glutamil-transpeptidasa, làctic-deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, sediment d'orina i proteinúria.

- Proves coagulomètriques de determinació de l'AL: TP, TTPA, TC, TITD i TRVED.

- Estudi immunològic bàsic: AAN, Ac anti-ADN nadiu, Ac anti-ENA (Ro, La, Sm, RNP) i factors del complement (C_3 , C_4 i CH_{50}).

4. Determinació dels AAC.

Als malalts sotmesos a tractament amb prednisona, l'extracció de sang per als diferents paràmetres analítics es va efectuar a les 24 hores de l'última dosi.

La biologia general es va determinar el mateix dia de l'extracció de sang. Per a la pràctica de les proves coagulomètriques de determinació de l'AL es va extreure la sang en citrat trisòdic al 3,8% en una relació 9/1 (V/V) amb posterior centrifugat a 1000 g durant 30 minuts a 4°C, extracció del sobrenadant i congelació a -70°C fins a la seva utilització. Per a l'estudi immunològic bàsic i la determinació dels AAC, la sang coagulada, després de la seva desfibrinació (sèrum) i

centrifugació a 1000 g durant 30 minuts a 4°C, es va distribuir en aliquotes i congelar a -70°C en una seroteca.

Totes les dades clíniques i biològiques es van informatitzar i enregistrar a la memòria d'un ordinador IBM 3083.

5.1.1.2. SUBGRUPS CLINICO-BIOLÒGICS

Els 100 malalts es van distribuir en diversos subgrups amb la finalitat d'analitzar el comportament dels AAC en cadascun d'ells. No existien diferències significatives respecte a l'edat, sexe i el temps d'evolució de la malaltia entre aquests diversos subgrups.

5.1.1.2.1. MALALTS AMB TROMBOSIS

Es van distribuir els malalts en dos grups segons la presència o absència de fenòmens trombòtics actius arterials i/o venosos localitzats a qualsevol territori vascular. Al llarg dels 2 anys d'estudi, es van observar fenòmens trombòtics en 10 malalts. Els territoris afectats van ser els següents:

- Trombosis venoses: . Vena subclàvia esquerra (1).
- . Vena humeral esquerra (1).
- . Vena femoral dreta (2).

- . Venes tibial i poplità esquerres (2).
- . Venes suprahepàtiques (síndrome de Budd-Chiari) (1).

El diagnòstic de les trombosis dels vasos de les extremitats es va fer en base als signes clínics (presència de signes inflamatoris i edema a nivell local en el territori venós) i confirmació amb l'estudi ultrasònic amb sistema "doppler" i/o flebografia. El diagnòstic de la síndrome de Budd-Chiari es va fer en base als signes clínics i ecogràfics abdominals.

- Trombosis arterials:
 - . Arteries cerebrals (accidents vasculars cerebrals) (2).
 - . Arteries coronàries (àngor) (2).

El diagnòstic dels accidents vasculars cerebrals es va fer en base als signes clínics i confirmació amb tomografia axial computadoritzada. El diagnòstic dels àngors es va fer en base als símptomes clínics i signes electrocardiogràfics. En un cas es va practicar arteriografia coronària que no va objectivar alteracions.

5.1.1.2.2. MALALTES AMB ANTECEDENTS D'AVORTAMENTS

Cap malalta no va presentar un avortament espontani al llarg dels dos anys de seguiment, per la qual cosa es van distribuir les malaltes en dos grups segons la presència o absència

d'antecedents previs d'avortaments. De les 93 malaltes estudiades, 12 havien presentat un o més avortaments espontanis.

5.1.1.2.3. MALALTS AMB TROMBOCITOPÈNIA

Al llarg dels 2 anys d'estudi, 17 malalts van presentar trombocitopènia (<100.000 plaquetes/ mm^3), per la qual cosa es van distribuir els malalts en altres dos grups segons la presència o absència d'aquesta manifestació biològica.

5.1.1.2.4. MALALTS AMB AFECCIÓ DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Es van objectivar 16 malalts amb manifestacions clíniques d'afecció del sistema nerviós central, els quals presentaven les següents patologies neurològiques:

- Cefalea de tipus migranya: 14.
- Epilepsia: 2.

En base a aquestes troballes es van distribuir els malalts en dos grups segons la presència o absència d'aquestes manifestacions. No es van incloure al primer grup les 2 malaltes que van presentar un accident vascular cerebral. Tampoc no es van incloure els malalts amb símptomes depressius, donat que en tots els casos estudiats aquests símptomes eren lleus.

5.1.1.2.5. MALATS AMB ALTRES MANIFESTACIONS CLÍNICO-BIOLÒGIQUES

També es van distribuir els malalts segons la presència o absència d'afecció articular, cutània, pleuro-pericàrdica, renal, vasculítica i hematològica diferent a la trombocitopènia (anèmia hemolítica, neutropènia i limfopènia).

5.1.1.2.6. MALATS EN ACTIVITAT CLÍNICA

Es van distribuir els malalts segons la presència o absència d'activitat clínica lúpica. Es va considerar que hi havia activitat quan existia un o més dels següents criteris de l'ARA modificats (142,428): 1) Artritis, 2) Serositis, 3) Erupció cutània i/o vasculitis, 4) Miositis, 5) Alteracions neuropsiquiàtriques (no atribuïbles a la terapèutica), 6) Nefropatia activa (143,159), 7) Trombocitopènia (<100.000 plaquetes/ mm^3) i 8) Anèmia hemolítica.

En base a aquests criteris es van obtenir 40 determinacions en fase activa de la malaltia i 60 en un període d'inactivitat de la mateixa.

5.1.2. GRUP CONTROL DE MALALTS AMB ALTRES PATOLOGIES AUTOIMMUNES

Amb la finalitat de comparar la incidència dels AAC en el LES amb la que existeix en altres patologies autoimmunes, es va determinar el títol d'aquests anticossos en un grup de 107 malalts afectes d'esclerosi sistèmica progressiva, dermatomiositis-polimiositis, artritis reumatoïde, arteritis de Horton, cirrosi biliar primària o púrpura trombocitopènica idiopàtica.

5.1.2.1. ESCLEROSI SISTÈMICA PROGRESSIVA

Aquest grup estava format per 13 malaltes diagnosticades d'esclerosi sistèmica progressiva en base als criteris de l'ARA (429). L'edat mitjana del grup era de $48,54 \pm 12,32$ anys (límits: 24 - 57 anys).

5.1.2.2. DERMATOMIOSITIS-POLIMIOSITIS

Aquest grup estava constituït per 16 malalts (12 homes i 4 dones) diagnosticats de dermatomiositis i/o polimiositis, d'acord amb els criteris de l'ARA (430). L'edat mitjana del grup era de $56,23 \pm 13,24$ anys (límits 34 - 76 anys).

5.1.2.3. ARTRITIS REUMATOÏDE

Aquest grup estava format per 15 malalts (12 dones i 3 homes) diagnosticats d'artritis reumatoïde segons els criteris de l'ARA (431). L'edat mitjana del grup era de $43,34 \pm 11,18$ anys (límits: 34 - 56 anys).

5.1.2.4. ARTERITIS DE HORTON

Aquest grup estava constituït per 24 malalts (12 homes i 12 dones) diagnosticats d'arteritis de Horton mitjançant biòpsia de l'artèria temporal (432,433). La seva edat mitjana era de $67,35 \pm 11,76$ anys (límits: 61 - 89 anys).

5.1.2.5. CIRROSI BILIAR PRIMÀRIA

Aquest grup estava format per 16 malalts (15 dones i 1 home) diagnosticats de cirrosi biliar primària mitjançant biòpsia hepàtica (434,435). La seva edat mitjana era de $52,34 \pm 12,68$ anys (límits: 32 -62 anys).

5.1.2.6. PÚRPURA TROMBOCITOPÈNICA IDIOPÀTICA

Aquest grup estava compost per 23 malalts (13 dones i 10 homes) diagnosticats de PTI en base a les manifestacions clíniques i biològiques (436). L'edat mitjana era de $34,11 \pm 11,59$ anys (límits: 21 - 44 anys).

5.1.3. GRUP CONTROL DE PERSONES SANES

Aquest grup control estava format per 100 persones sanes (60 dones i 40 homes) donants voluntaris de sang amb serologia luètica negativa. L'edat mitjana del grup era de $43,78 \pm 14,43$ anys (límits: 22 - 53 anys).

5.2. MÈTODES DE LABORATORI

5.2.1. ANTICOSSOS ANTICARDIOLIPINA

La detecció dels AAC es realitza actualment mitjançant tècniques d'immunoassaig, com són el RIA i l'ELISA (23,24). Donats els avantatges que reporta la tècnica d'ELISA (23), aquesta ha estat la utilitzada en el present treball (fig. 4). Seguint la descripció original de Loizou et al.(23), en una primera fase es van realitzar diversos assaigs amb la finalitat de determinar les

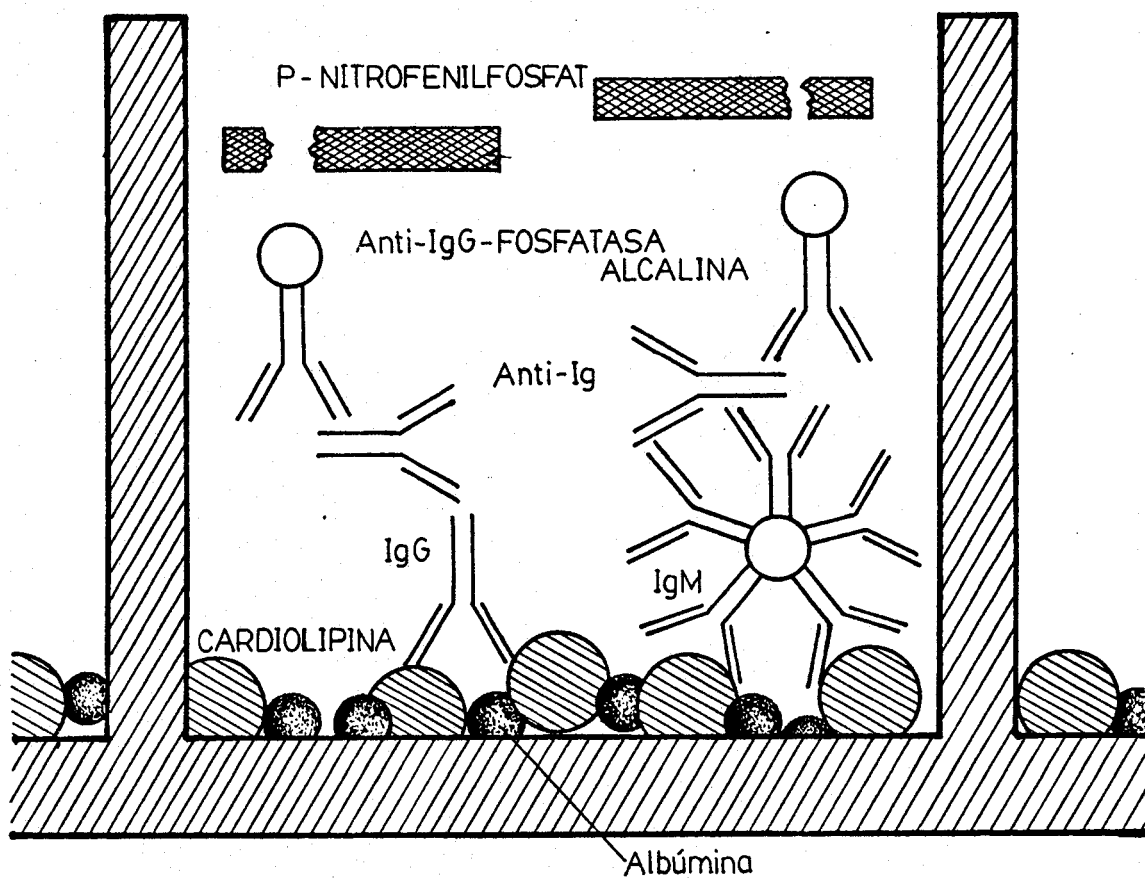


Figura 4.- Desenvolupament esquemàtic de la tècnica d'ELISA.

condicions òptimes al nostre laboratori per a la detecció dels AAC mitjançant aquesta tècnica. A continuació es detalla el desenvolupament del protocol realitzat per a determinar aquestes condicions òptimes.

5.2.1.1. FIXACIÓ DE LA CARDIOLIPINA

Es dilueix cardioplipina (Sigma[®]) en etanol i es col·loca una al·iquota d'aquesta dilució a cadascun dels pouets d'una placa d'ELISA de poliestirè (Dinatek[®]). L'evaporació del líquid sobrant es realitza fent fluir un corrent de nitrogen. Es van realitzar diversos assaigs amb la finalitat de determinar la quantitat òptima de cardioplipina que calia fixar a les plaques.

5.2.1.2. BLOQUEIG DE LES UNIONS INESPECÍFIQUES

Amb la finalitat d'evitar les unions inespecífiques dels anticossos a les parets de la placa, s'afegeix a cada pouet una solució de tampó fosfat ("phosphate buffered saline", PBS) i sèrum fetal de vedell ("fetal calf serum", FCS). Aquesta solució es prepara mesclant 9 volums de PBS amb 1 de FCS. Es van realitzar diverses proves per a determinar la quantitat òptima a utilitzar d'aquesta solució i el temps i la temperatura de la incubació posterior.

5.2.1.3. UNIÓ AMB EL SÈRUM PROBLEMA

A continuació s'afegeix a cada pouet el sèrum problema. Els diversos assaigs van anar dirigits a determinar la seva concentració òptima i el temps i la temperatura de la incubació posterior.

5.2.1.4. UNIÓ AMB EL PRIMER ANTICÒS

A continuació s'afegeix a cada pouet anticòs de cabra (IgG) anti-immunoglobulina humana (anti-IgG o anti-IgM).

5.2.1.5. UNIÓ AMB EL SEGON ANTICÒS

S'afegeix després anticòs de conill anti-IgG de cabra conjugat amb fosfatasa alcalina. Es van realitzar també diversos assaigs amb la finalitat de determinar les concentracions òptimes del primer i segon anticossos i els temps i les temperatures òptimes d'incubació.

5.2.1.6. UNIÓ AMB EL SUBSTRATE

Es va utilitzar com a substrate p-nitrofenilfosfat diluït en tampó dietanolamida (1 mg/ml). Els diversos assaigs van anar dirigits a determinar la quantitat òptima a utilitzar i el temps i la temperatura òptimes d'incubació.

5.2.1.7. LECTURA DE LES DENSITATS ÒPTIQUES

S'atura la reacció amb hidròxid sòdic i es medeix la densitat òptica (DO) de cada pouet a 405 nanòmetres de longitud d'onda en el lector de plaques d'ELISA.

5.2.2. ANTICOAGULANT LÚPIC

Les proves coagulomètriques utilitzades per al diagnòstic de l'AL van ser les següents:

1.- Proves de coagulació rutinàries: Temps de protrombina (TP) i temps de tromboplastina parcial activat (TTPA). Si la relació entre el TTPA del plasma problema i el del plasma normal era superior a 1,17 es va considerar la presència d'un anticoagulant o un dèficit factorial. Amb la finalitat de descartar aquest últim, en els casos d'alteració del TTPA es va procedir a la incubació del plasma problema amb plasma normal

(1:1) durant una hora, amb nova determinació del TTPA. Si persistia l'alteració del TTPA s'atribuïa a la presència d'un anticoagulant (437).

2.- Temps de caolí (TC): Incubació de 0,2 ml del plasma problema amb 0,1 ml d'una suspensió de caolí (20 mg/ml en ClNa 0,9 gr/dl) durant 3 minuts a 37°C. A continuació s'afegeix 0,1 ml de Cl₂Ca (0,03 M) i es determina el temps de coagulació. En base al grup control sa, el valor mitjà va ser de 75,70 ± 14,30 sg i es va considerar patològic un temps de caolí superior a 120 sg (alfa = 0,001)(437).

3.- Temps d'inhibició de la tromboplastina tissular diluïda (TITTD): Incubació a 37°C de 0,1 ml del plasma problema amb 0,1 ml d'una dilució 1/50 o 1/500 de tromboplastina (Simplastin[®]) en ClNa 0,9 gr/dl durant 5 minuts. S'afegeix a continuació 0,1 ml de Cl₂Ca 0,025 M i es determina el temps de coagulació. En base al grup control es va considerar un TITTD patològic una relació TITTD problema/TITTD grup control sa superior o igual a 1,46 per a la dilució de 1/50 i a 1,40 per a la dilució de 1/500 (alfa= 0,001)(437).

4.- Temps del verí d'escurçó de Russell diluït (TVERD): El verí d'escurçó de Russell es reconstitueix amb 2 ml de sèrum salí i es dilueix (1/200) en tris-buffer salí. Com a fosfolipid s'utilitza Trombofax[®] (Ortho[®]) diluït (1/8) en tris-buffer salí (ClNa 0,15 M, tris 0,02 M, pH: 7,4). A continuació s'incuba 0,1 ml

del plasma problema amb 0,1 ml del veri de l'escurçó de Russell i 0,1 ml del fosfolípid diluït, durant 30 sg a 37°C. Posteriorment s'afegeix 0,1 ml de Cl_2Ca 0,03 M i es determina el temps de coagulació. La normalitat obtinguda amb el grup control va ser de $28,95 \pm 2,17$ sg i es va considerar patològic tot valor superior als 36 sg ($\alpha = 0,001$)(437).

La prolongació del TVERD en aquells malalts amb AL es normalitza quan es substitueix el fosfolípid utilitzat per plaquetes rentades i tractades amb ionòfer (20). Per a això, en primer lloc cal obtenir plasma ric en plaquetes, mitjançant la centrifugació de la sang anticoagulada amb citrat a 150 g durant 15 minuts a temperatura ambiental. El plasma així obtingut es centrifuga durant 10 minuts a 1500 g en tampó tris-EDTA (C1Na 0,15 M, tris 0,02 M, EDTA 0,001 M i glucosa 0,05 M, pH: 7,4). A continuació, les plaquetes es resuspenen a una concentració de $8 \cdot 10^9/dl$ en el mateix tampó però sense EDTA. Posteriorment s'incuben durant 5 minuts a temperatura ambiental amb 1 micromol d'una solució 5 mM d'ionòfer A23187 en etanol (Menasim[®]) (concentració final. 2,5 micromolar). Un cop acabat el procés de tractament amb ionòfer, es substitueix en la realització del TVERD el Trombofax[®] per una suspensió de 0,1 ml de plaquetes tractades amb ionòfer (437).

5.2.3. SEROLOGIA LUÈTICA

Per a la determinació de la serologia luètica ha estat emprada la prova reagínica d'aglutinació en porta anomenada RPR, utilitzant reactius comercialitzats (RPR-carbon-Cromatest[®], Knickerbocker, S.A.E.).

5.2.4. ANTICossos ANTI-ADN NADIU

Els Ac anti-ADN nadiu han estat determinats per RIA en base a la tècnica de Farr (438) i comercialitzada per Amersham (Anglaterra. Codi IM-76).

1. Les mostres del sèrum problema es dilueixen a 1/10 en tampó i s'analitzen paral·lelament a un grup de sèrums que pertanyen a malalts afectes de LES amb una concentració d'Ac anti-ADN nadiu coneguda.

2. Les alíquotes de 50 ul, tant dels sèrums estàndard com dels problemes, es calenten a 56°C durant 30 minuts, per tal d'inactivar el complement sèric.

3. S'afegeixen 50 ul de solució d'ADN-¹²⁵I a cada tub d'assaig i es deixen incubar durant una hora a 37°C i posteriorment durant tota una nit a 2-4°C.

4. A continuació es procedeix a la precipitació de l'ADN unit mitjançant una solució saturada de sulfat amònic (agitació immediata del tub després de l'addició de sulfat amònic).

5. Es centrifuga durant 15 minuts a 1000 g i posteriorment es determina el 125 I del precipitat.

6. Els valors estàndard s'utilitzen per a construir una corba patró, en la qual es llegeixen directament els valors dels sèrums problema.

7. Normalitats: Es consideren valors normals d'Ac anti-ADN nadiu les xifres inferiors a 25 mU/ml.

5.2.5. ANTICOSSOS ANTI-ENA

Dels diferents anticossos anti-ENA han estat determinats els anti-Ro, anti-La, anti-Sm i anti-RNP.

La detecció dels anticossos anti-Ro i anti-La es va fer mitjançant la tècnica de contraimmunolectroforesi. Per la seva banda, la detecció dels anti-Sm i anti-RNP es va fer per immunodifusió doble. El desenvolupament d'aquestes tècniques va ser realitzat segons pautes estandarditzades en plaques comercials (Behring Diagnostics[®])(439,440).

5.2.6. FACTORS DEL COMPLEMENT

Els valors de C_3 i C_4 han estat determinats per immunodifusió radial, utilitzant plaques comercials (Behringwerke®). Els valors de normalitat oscil·len entre 80-140 mg/dl per al C_3 i 20-50 mg/dl per al C_4 . Han estat considerats valors disminuïts xifres inferiors a 70 i 15 mg/dl, respectivament.

El CH_{50} medeix el complement des del punt de vista global. Per a la seva determinació ha estat utilitzada la tècnica de Lachmann (152). Els valors de la normalitat oscil·len entre 400-700 U.U. Un valor inferior a 300 U.U. ha estat considerat com a una xifra baixa de CH_{50} .

5.2.7. ALTRES DETERMINACIONS

La creatinina, BUN, proteïnograma, etc, han estat determinats mitjançant les tècniques habituals ja estandarditzades al Laboratori de Bioquímica de l'Hospital Clínic de Barcelona. Els AAN mitjançant la tècnica d'immunofluorescència indirecta (441) estandarditzada al Laboratori d'Immunologia del mateix hospital.

5.3. MÈTODES ESTADÍSTICS

5.3.1. SENSIBILITAT, ESPECIFICITAT, VALORS DE PREDICCIÓ, EFICÀCIA, RISC RELATIU I RAÓ DE RAONS

Mitjançant la realització de tables binàries (tabla 4) han estat calculats la sensibilitat, especificitat, valors de predicció positiva i negativa, eficàcia, risc relatiu i raó de raons de les diferents proves analitzades (442-447).

- Sensibilitat (S): Probabilitat de que la prova sigui positiva quan l'alteració analitzada és present.

$$S = \frac{\text{Vertaders positius } a}{\text{Total malalts amb l'alteració } a + c}$$

- Especificitat (E): Probabilitat de que la prova sigui negativa quan no existeix l'alteració analitzada.

$$E = \frac{\text{Vertaders negatius } d}{\text{Total malalts sense l'alteració } b + d}$$

Tabla 4.- Model de tabla binària

		ALTERACIÓ O PATOLOGIA	
		PRESENT	ABSENT
i FACTOR i DE RISC i O i PROVA	POSITIU	Vertader positiu (a)	Fals positiu (b)
	NEGATIU	Fals negatiu (c)	Vertader negatiu (d)

- Valor de predicció positiva (VP+): Probabilitat de que l'alteració analitzada existeixi quan la prova sigui positiva.

$$VP+ = \frac{\text{Vertaders positius}}{\text{Vertaders positius} + \text{falsos positius}} = \frac{a}{a + b}$$

- Valor de predicció negativa (VP-): Probabilitat de que l'alteració analitzada no existeixi quan la prova resulta negativa.

$$VP- = \frac{\text{Vertaders negatius}}{\text{Falsos negatius} + \text{vertaders negatius}} = \frac{d}{c + d}$$

- Eficàcia (Ef): Proporció de resultats correctes.

$$Ef = \frac{\text{Vertaders positius} + \text{vertaders negatius}}{\text{Total de casos}} = \frac{a + d}{N}$$

- Risc relatiu (RR): Probabilitat condicionada de presentar la patologia.

$$RR = \frac{a/a+b}{c/c+d}$$

- Raó de raons ("odds ratio", OR): Cocient entre la raó de malalts exposats al factor de risc i la raó dels que no ho estan.

$$OR = \frac{a/c}{b/d}$$

5.3.2. MITJANA ARITMÈTICA I DESVIACIÓ ESTÀNDAR

En tots els grups estudiats, la mitjana aritmètica (\bar{x}) i la desviació estàndard (DE) dels diferents paràmetres estudiats han estat definides de la següent manera:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{N} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N} = \frac{\sum x}{N}$$

on N és el numero de dades i x el valor de cadascuna d'elles.

$$DE = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - N\bar{x}}{N - 1}} = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N - 1}}$$

on x representa les desviacions de cadascun dels valors x_i respecte a la mitjana (444).

5.3.3. COMPARACIÓ DE CARACTERS QUALITATIUS

5.3.3.1. ANÀLISI UNIVARIADA

5.3.3.1.1. PROVA DE LA χ^2

Per a determinar la relació entre dos caracters qualitatus amb dades independents (factor de risc versus patologia) ha estat utilitzada la prova de la χ^2 , segons la fórmula (445):

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^e (n_{oi} - n_{ci})^2}{n_{ci}}$$

on n_o és el número de freqüències observades i n_c el número de freqüències calculades.

El valor obtingut es compara amb la llei de X^2 amb $v = (k-1)(l-1)$ graus de llibertat.

En el cas particular $k = l = 2$, és a dir, caracters qualitativs amb dues categories estudiades, ha estat utilitzada la taula de contingència 2×2 .

La significació s'obté a les taules científiques Geigy (446) de la distribució X^2 per a $v = k - 1$ graus de llibertat i risc alfa = 0,05. Han estat acceptats com a significació estadística vàlida valors de $p < 0,05$.

5.3.3.1.2. PROVA EXACTA DE FISHER

Per a mostres petites, quan les freqüències calculades són iguals o inferiors a 3, ha estat aplicada la prova exacta de Fisher, segons la fórmula (447):

$$F = \frac{n_{11}! \cdot n_{12}! \cdot n_{21}! \cdot n_{22}!}{n_{01}! \cdot n_{02}! \cdot n_{03}! \cdot n_{04}! \cdot n_{t}!}$$

on n_{ij} és cada una de les freqüències observades, n_{11} és el total de malalts amb el factor de risc, n_{12} és el total sense factor de risc, n_{21} és el total amb la patologia, n_{22} el total sense la

patologia i n , el total absolut. Han estat acceptats com a significació estadística vàlida valors de $p < 0,05$.

5.3.3.2. ANÀLISI MULTIVARIADA. ANÀLISI DISCRIMINANT PER PASSOS

Per a determinar la gradació de la relació entre diversos caràcters qualitius amb dades independents ha estat aplicada l'anàlisi discriminant per passos ("stepwise discriminant analysis"), utilitzant el paquet estadístic BMDP (448). Han estat també acceptats com a significació estadística vàlida els valors de $p < 0,05$.

5.3.4. INTÈRVAL DE CONFIANÇA

L'interval de confiança (IC) proporciona el valors límits entre els quals es troba la diferència entre dues proporcions o mitjanes que ha estat trobada com a estadísticament significativa.

En aquest treball ha estat utilitzat l'interval de confiança al 95 % entre dues proporcions, segons la fórmula (449):

$$IC = p \pm (1,96 \times \sqrt{p \times (1-p)})/n$$

on p és la proporció o diferència trobada a l'estudi i n el número de malalts analitzats.

5.3.5. DISTRIBUCIONS DE LES VARIABLES CONTÍNUES

5.3.5.1. DISTRIBUCIÓ NORMAL

Per a verificar la hipòtesi de normalitat de la distribució de les variables contínues (distribució Gaussiana) estudiades a les mostres petites ($N < 30$) de la població dels diferents grups, ha estat utilitzada la prova de Kolmogorof-Smirnov (445).

Aquesta prova verifica la hipòtesi de normalitat de distribució d'una variable quantitativa contínua, calculant les diferències (D_i) existents entre els percentatges acumulats (P_i), corresponents als valors x_i del caràcter observats a la mostra i els percentatges acumulats (s_i) corresponents al mateix valor x_i , en el supòsit de que aquesta mostra segueixi una llei normal (m, σ^2). Donat que no es coneix la mitjana (M) ni la variància (σ^2) de la població, s'utilitza la mitjana (\bar{x}) i la variància (s^2) observades a la mostra, com a oscil·lació de M i σ^2 de la població.

Els valors límits d'aquestes diferències $D(N, \alpha)$ en funció del tamany de la mostra (N) i per a riscos $\alpha = 0,05$ i $0,01$ venen donats per les tables de Lilliefors (445).

5.3.5.2. DISTRIBUCIÓ LOG-NORMAL

La distribució log-normal o logarítmico-normal és asimètrica i presenta les característiques següents:

$$\text{Moda} = \text{antilog} (M_{100 \kappa} - 2,3026 \sigma^2_{100 \kappa})$$

$$\text{Mediana} = \text{antilog} M_{100 \kappa}$$

$$\text{Mitjana} = \text{antilog} (M_{100 \kappa} + \sigma^2_{100 \kappa})$$

Si s'inscriu x en una escala logarítmica d'abscises o, el que és el mateix, $\log x$ en una escala linial d'abscises, la distribució asimètrica es fa normal simètrica (446).

5.3.6. PROVA D'HOMOGENEÏTAT DE VARIABLES QUANTITATIVES. PROVA NO PARAMÈTRICA DE MANN-WHITNEY

Per a la comparació de dues mitjanes observades en mostres grans amb dades independents i distribució no normal, ha estat aplicada la prova no paramètrica de l'índex U de Mann-White (445):

$$U_{12} = \frac{n_1 \cdot n_2 + n_1 \cdot (n_1 + 1)}{2 - R_1}$$

$$U_{e1} = \frac{n_1 \cdot n_e + n_e \cdot (n_e + 1)}{2 - R_e}$$

i es compleix que $U_{1e} + U_{e1} = n_1 \cdot n_e$.

Per a això cal transformar la variable quantitativa en ordinal. R_1 és la suma de tots el números del grup 1 i R_e la del grup 2, mentre que n_1 i n_e són el número d'individus de cada grup.

La significació estadística ha estat obtiguda a les tables científiques Geigy (446), observant el valor d'U per al número d'individus i un risc alfa = 0,05. Si l'índex U mínim calculat és inferior al de la tabla, la diferència entre els grups és significativa a nivell $p < 0,05$.

5.3.7. COEFICIENT DE CORRELACIÓ DE SPEARMAN

Per a estudiar la correlació entre dues variables qualitatives que segueixen distribucions no normals ha estat aplicat el coeficient de correlació de Spearman, utilitzant el paquet estadístic BMDP (448).

5.3.8. SUPORT INFORMÀTIC

La informació de les fulles de recollida de dades de cada malalt va ser emmagatzemada a un dels ordinadors del Centre de Càlcul de la Universitat de Barcelona.

Mitjançant els programes comercialitzats EPISTAT, BMDP i SPSS implantats a l'ordinador IBM del Servei de Medicina Interna General i a la terminal de la Facultat de Medicina de l'Ordinador del Centre de Càlcul han estat realitzades les diferents proves estadístiques aplicades en aquesta Tesi Doctoral.

VI. RESULTATS

6.1. ANÀLISI CLÍNICA DE LA SÈRIE

La sèrie estava constituïda per 100 malalts amb LES, dels quals 93 eren dones (93 %) i 7 homes (7 %). La seva edat mitjana (\pm DE) era de $37,52 \pm 16,24$ anys, amb límits entre els 18 i 83 anys. La simptomatologia inicial atribuïble al LES es va presentar fonamentalment entre la segona i tercera dècades de la vida (62 %). Només en 10 malalts (10 %) es va iniciar després dels 50 anys. El temps mitjà (\pm DE) d'evolució clínica de la malaltia va ser de $7,24 \pm 4,32$ anys, amb límits entre els 4 mesos i 20 anys.

Les manifestacions clíniques més freqüents al llarg de l'evolució de la malaltia es detallen a la figura 5. Hi destaca la incidència d'artritis amb 65 casos (65 %) i les manifestacions cutànies amb 55 (55 %), principalment eritema en vespertili.

En 33 casos (33 %) es va objectivar la presència de nefropatia i en 32 d'ells es va efectuar estudi anatomopatològic. La distribució d'aquest estudi segons la classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) modificada, queda reflectida a la tabla 5.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA SÈRIE

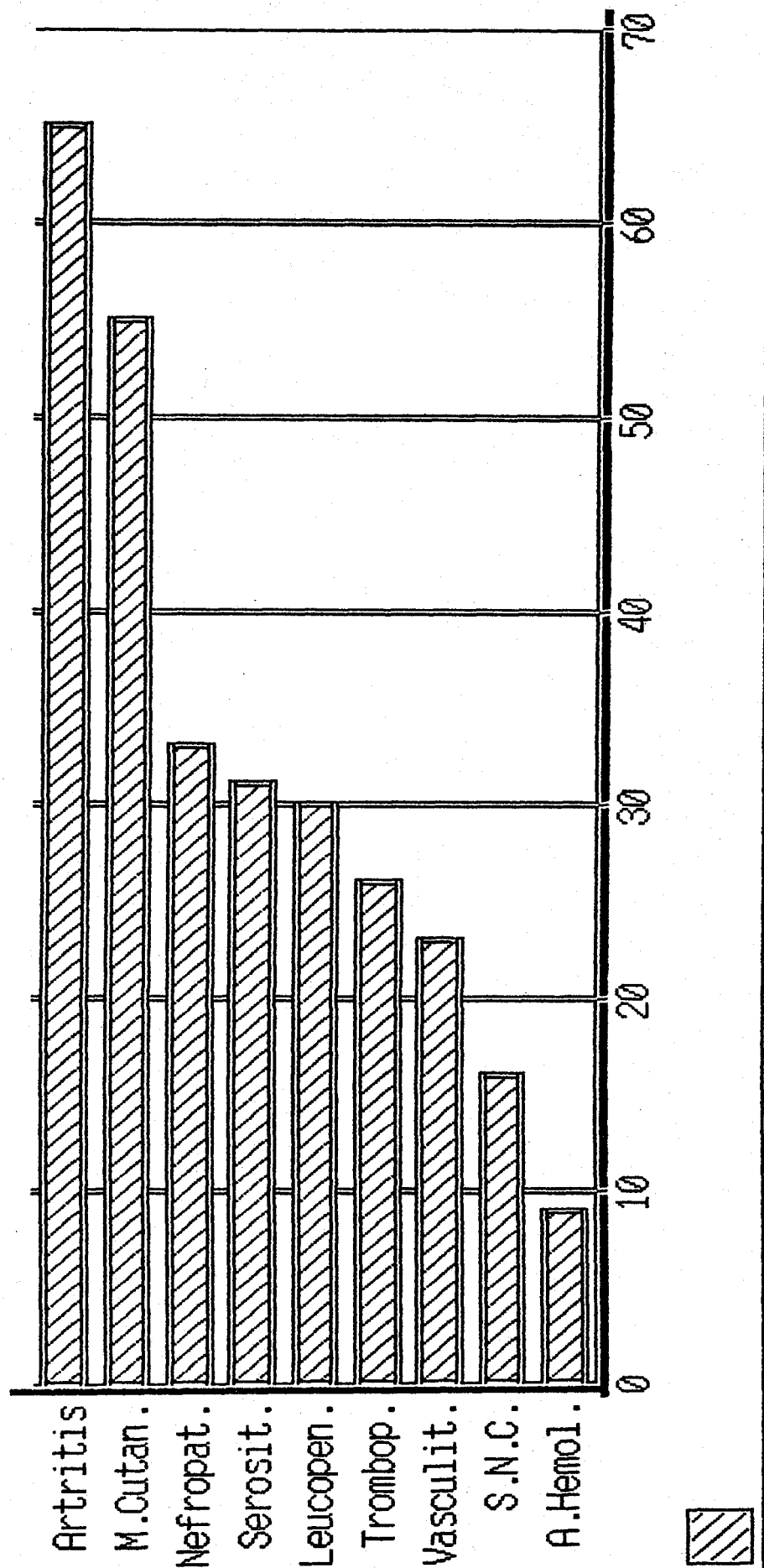


Figura 5.- Manifestacions clíniques de la sèrie.

Tabla 5.- Tipus anatomopatològics de nefropatia lúpica objectivats a la sèrie

- Tipus I (normal): 0
- Tipus II (glomerulonefritis mesangial): 5
- Tipus III (glomerulonefritis proliferativa segmentària i focal): 11
- Tipus IV (glomerulonefritis proliferativa difusa): 10
- Tipus V (glomerulonefritis membranosa): 5
- Altres (nefropatia tubulo-intersticial): 1

Altres manifestacions clíniques observades van ser serositis (pleuritis i/o pericarditis) en 31 casos (31 %), vasculitis i fenomen de Raynaud en 23 (23 %) i afecció del sistema nerviós central (migronya i/o epilepsia) en 16 (16 %).

Les alteracions hematològiques observades van ser: leucopènia en 30 casos, trombocitopènia en 26 i anèmia hemolítica en 9.

Un total de 54 malalts rebia tractament amb corticoides durant l'estudi. Només en 16 d'ells la dosi diària de prednisona era superior a 20 mg. Un malalt era tractat també amb ciclofosfamida (25 mg/dia) i un altre amb azatioprina (100 mg/dia).

6.2. ESTUDI DELS ANTICOSSOS ANTICARDIOLIPINA

Els resultats d'aquest estudi es poden dividir en tres apartats: d'una banda, l'estandardització de la tècnica d'ELISA de determinació dels AAC (6.2.1); d'altra, l'anàlisi de la seva incidència (6.2.2); i, finalment, les seves associacions amb diferents manifestacions clíniques i biològiques del LES (6.2.3).

6.2.1. ESTANDARDITZACIÓ DE LA TÈCNICA D'ELISA

L'estandardització de la tècnica d'ELISA de determinació dels AAC va tenir tres parts ben definides: en primer lloc, la realització de la tècnica en les condicions òptimes trobades al nostre laboratori (6.2.1.1); en segon lloc, l'assignació als resultats d'unes unitats de càlcul senzill (6.2.1.2); i, finalment, la determinació dels valors de normalitat (6.2.1.3).

6.2.1.1. REALITZACIÓ DE LA TÈCNICA

La tècnica finalment desenvolupada al nostre laboratori es detalla a continuació:

6.2.1.1.1. FIXACIÓ DE LA CARDIOLIPINA

Es dilueix cardioplipina (Sigma[®]) en etanol a una concentració de 50 ugr/ml i es posen 30 ul d'aquesta dilució a cadascun dels pouets d'una placa d'ELISA de poliestirè (Dinatek[®]). L'evaporació del líquid sobrant es realitza fent fluir un corrent de nitrogen. La quantitat resultant de cardioplipina fixada a cada pouet és de 1,5 ugr.

6.2.1.1.2. BLOQUEIG DE LES UNIONS INESPECÍFIQUES

Amb la finalitat d'evitar les unions inespecífiques dels anticossos a les parets de la placa, s'afegeix a cada pouet una solució de PBS-FCS. A cada pouet es col.loquen 110 ul d'aquesta solució i es deixen incubar durant 2 hores a la temperatura del laboratori. Finalment es renten els pouets amb PBS (quatre rentats amb 120 ul de PBS i agitació durant 2 minuts).

6.2.1.1.3. UNIÓ AMB EL SÈRUM PROBLEMA

A continuació s'afegeix per triplicat cada sèrum problema (100 ul d'una dilució 1/100 en PBS-FCS). Per a la comparació dels resultats, cal disposar també de pouets sense sèrum (pouets blancs) als quals s'afegeixen 100 ul de PBS-FCS. Posteriorment es deixen incubar durant una hora a la temperatura del laboratori i es tornen a rentar els pouets amb PBS.

6.2.1.1.4. UNIÓ AMB EL PRIMER ANTICÒS

A continuació s'afegeix anticòs de cabra (IgG) anti-immunoglobulina humana (100 ul d'una dilució 1/4000 en PBS-FCS). A la meitat dels pouets es posa anticòs anti-IgG i a l'altra meitat anti-IgM. Posteriorment es deixen incubar durant una hora a la temperatura del laboratori i es tornen a rentar amb PBS.

6.2.1.1.5. UNIÓ AMB EL SEGON ANTICÒS

S'afegeix després anticòs de conill anti-IgG de cabra conjugat amb fosfatasa alcalina (100 ul d'una dilució 1/1000 en PBS-FCS). A continuació es procedeix a incubar durant una hora a la temperatura ambiental i a rentar els pouets amb tampó de dietanolamida (pH: 9,8).

6.2.1.1.6. UNIÓ AMB EL SUBSTRACTE

S'utilitza com a substracte p-nitrofenilfosfat, el qual es dilueix en tampó dietanolamida (1 mg/ml). A cada pouet s'afegeixen 100 ul d'aquesta dilució i es deixen incubar a les fosques i a 25°C durant 50 minuts.

6.2.1.1.7. LECTURA DE LES DENSITATS ÒPTIQUES

S'atura la reacció amb 50 ul d'hidròxid sòdic 3 M i es medeix la densitat òptica (DO) de cada pouet a 405 nanòmetres de longitud d'onda en el lector de plaques d'ELISA (Organon ®).

6.2.1.2. ASSIGNACIÓ D'UNITATS ALS RESULTATS

Amb la finalitat d'assignar als resultats obtinguts unes unitats de càlcul senzill, aquests s'expressen com a índex d'unió (IU) segons la fórmula:

$$\text{IU (sèrum problema)} = \frac{\text{DO (sèrum problema)} - \text{DO (pouets blancs)}}{\text{DO (grup control sa)} - \text{DO (pouets blancs)}}$$

El valor calculat és la mitjana del triplicat del sèrum problema. La unitat (1 U.) equival a una DO del sèrum problema igual a la DO del grup control sa. Com a control de qualitat de la tècnica es va utilitzar un grup de sèrums de referència, amb quantitats conegudes d'AAC, preparats a l'"Arthritis Research Laboratory" de l'Hospital St. Thomas de Londres i amablement cedits pel Dr. E.N. Harris, responsable del projecte KAPS (fig. 6). Els assaigs realitzats al nostre laboratori van ser considerats com a correctes donades les seves regressions lineals, coeficients de determinació i variacions interassaig (454).

6.2.1.3. DETERMINACIÓ DELS VALORS DE NORMALITAT

La determinació de l'IU dels 100 sèrums que componien el grup control de persones sanes va mostrar una distribució asimètrica amb diferències segons l'isotipus estudiat (AAC-IgG o AAC-IgM)

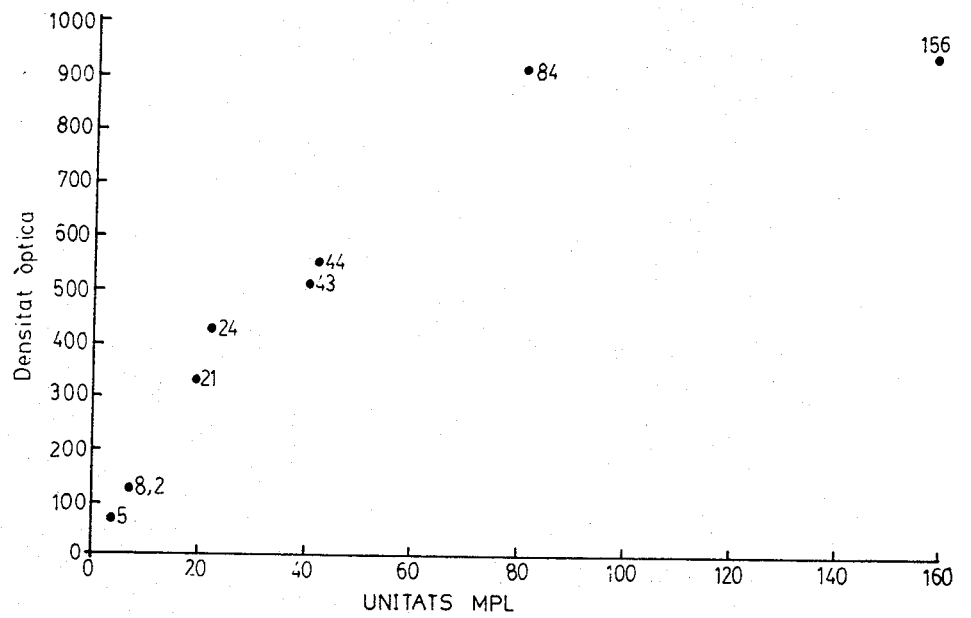


Figura 6.- Densitats òptiques (DO) i unitats MPL dels sèrums de referència (gentilesa del Dr. E.N. Harris).

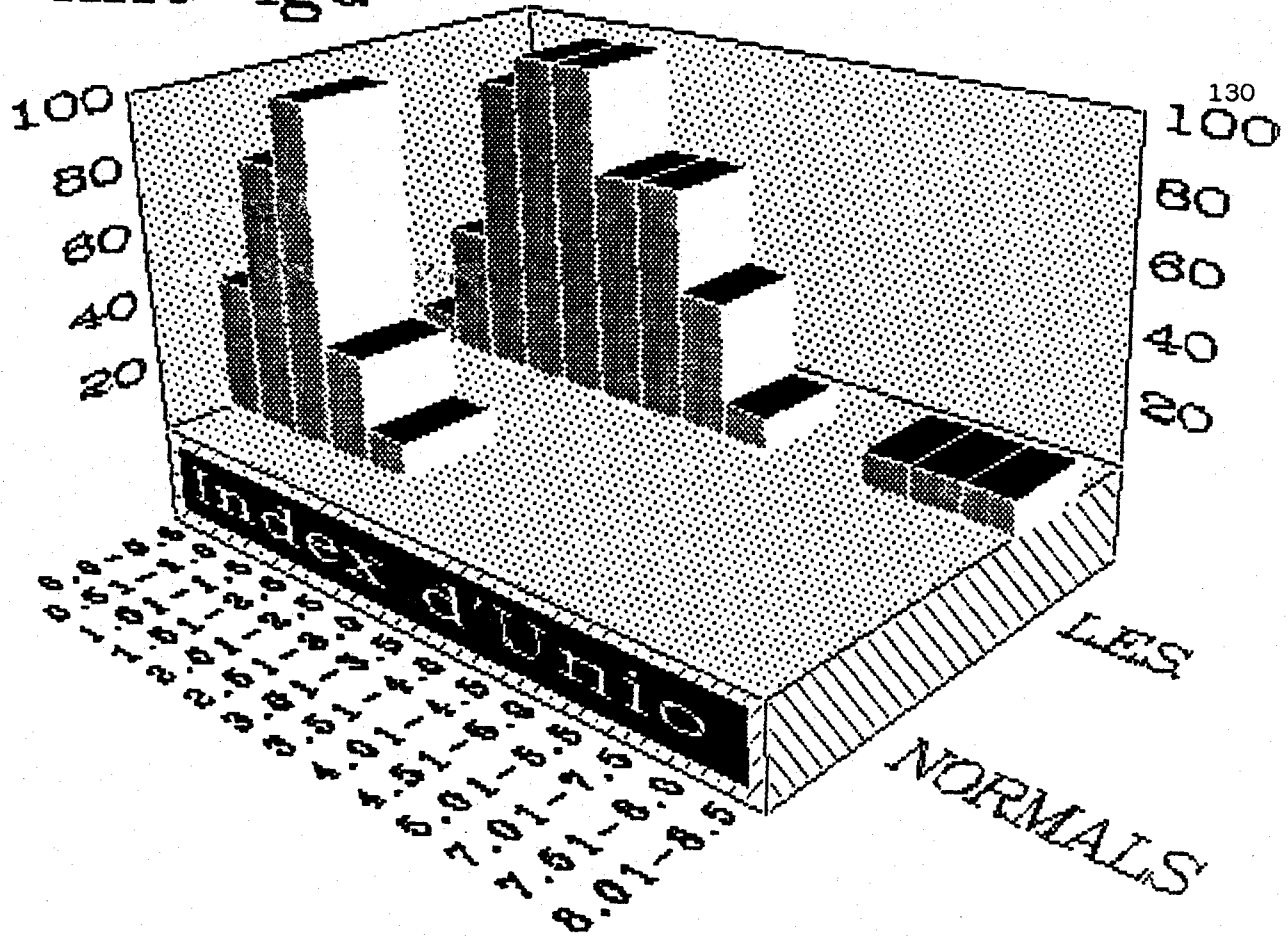
(fig. 7). Aquesta distribució passava a ser normal en convertir l'IU en el seu logaritme (distribució log-normal). Per a computar els valors patològics es van considerar tres nivells de positivitat: baix, moderat i alt. Un nivell positiu baix (+) es va considerar quan el logaritme de l'IU assolía una probabilitat del 98 % al 99 % de no pertànyer a un grup normal, un nivell positiu moderat (++) quan assolía una probabilitat del 99,1 % al 99,5 % i positiu alt (+++) quan era superior al 99,6 % (tabla 6). D'acord amb aquesta classificació, la distribució dels valors normals i patològics en funció de l'IU va ser la que es mostra a la tabla 7 i en funció de les desviacions estàndard (DE) la que apareix a la tabla 8.

6.2.2. INCIDÈNCIA DELS ANTICossos ANTICARDIOLIPINA

6.2.2.1. INCIDÈNCIA AL L.E.S.

Els AAC van ser positius en 36 dels malalts amb LES (36 %). Per isotipus, els AAC-IgG van ser positius en 24 malalts (24 %) i els AAC-IgM en 20 (20 %). Només 8 malalts (8 %) tenien simultàniament nivells positius d'ambdós isotipus. La distribució per graus de positivitat es detalla a la tabla 9 i les manifestacions clíniques d'aquests malalts a la 10.

AAC-IgG



AAC-IgM

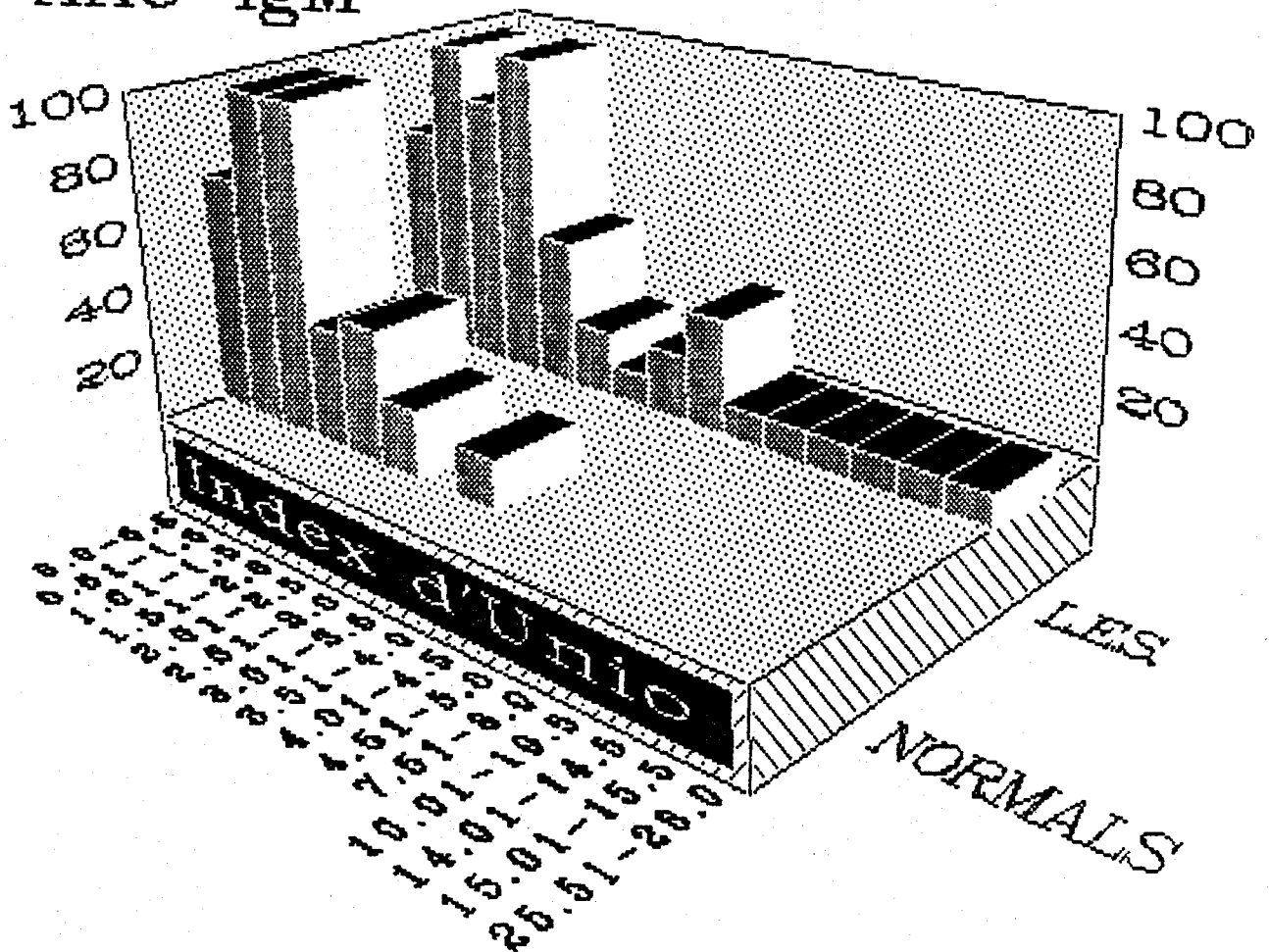


Figura 7.- Distribució a la població sana i als malalts amb LES dels isotipus d'AAC.

Tabla 6.- Nivells de positivitat segons les probabilitats de no pertànyer a un grup normal

Positiu baix	(+)	98 % - 99 %
Positiu moderat	(++)	99,1 % - 99,5 %
Positiu alt	(+++)	≥ 99,6 %

Tabla 7.- Distribució dels valors normals i patològics en funció de l'IU

	AAC-IgG	AAC-IgM
Normal (-)	0 - 2,84 U.	0 - 4,06 U.
Positiu baix (+)	2,85 - 3,29 U.	4,07 - 4,94 U.
Positiu moderat (++)	3,30 - 5,05 U.	4,95 - 6,00 U.
Positiu alt (+++)	\geq 5,06 U.	\geq 6,01 U.

Tabla 8.- Distribució dels valors normals i patològics en funció de les DE

	AAC-IgG	AAC-IgM
Normal (-)	0 - 3,76 DE	0 - 3,89 DE
Positiu baix (+)	3,77 - 4,69 DE	3,90 - 5,05 DE
Positiu moderat (++)	4,70 - 5,75 DE	5,06 - 6,45 DE
Positiu alt (+++)	\geq 5,76 DE	\geq 6,46 DE

Tabla 9.- Distribució per graus de positivitat dels malalts de la sèrie

	AAC-IgG	AAC-IgM
Positiu baix (+)	9	5
Positiu moderat (++)	9	2
Positiu alt (+++)	6	13
Total	24	20

Tabla 10.- Manifestacions clíniques dels malalts amb LES

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM	Manifestació
1	+	-	
2	+	+	An
3	+	-	N
4	+	-	T, Av, An
5	+	-	
6	+	+	T
7	-	+	P
8	-	+	
9	+	-	T, P
10	+	+	T
11	+	-	
12	+	-	P, Av
13	-	+	An
14	+	+	
15	-	+	N
16	-	+	N
17	+	-	
18	-	+	
19	+	-	T, P, Av
20	-	+	Av
21	-	+	An, N
22	+	+	P
23	+	-	
24	-	+	
25	-	+	

Tabla 10.- (continuació)

26	-	+	P
27	+	-	T
28	-	+	N
29	+	+	P, Av, An
30	+	+	T, An
31	+	+	P
32	+	-	
33	+	-	
34	+	-	
35	+	-	P
36	+	-	P

T = Trombosis, P = Trombocitopènia, An = Anèmia hemolítica,
 Av = Antecedents d'avortaments espontanis, N = Neutropènia.

6.2.2.2. INCIDÈNCIA A ALTRES PATOLOGIES AUTOIMMUNES

Amb la finalitat de conèixer si en el LES la incidència dels AAC era superior que en altres patologies autoimmunes, es van determinar els nivells d'AAC a altres sis malalties autoimmunes d'aparició relativament freqüent al nostre medi.

6.2.2.2.1. INCIDÈNCIA A L'ESCLEROSI SISTÈMICA PROGRESSIVA

Es van estudiar 13 malaltes afectes d'esclerosi sistèmica progressiva i només en una d'elles (8%) es va trobar un títol positiu d'AAC-IgG (tabla 11).

6.2.2.2.2. INCIDÈNCIA A LA DERMATOMIOSITIS-POLIMIOSITIS

Van ser estudiats 16 malalts diagnosticats de dermatomiositis-polimiositis i només en un d'ells (6%) es va detectar un títol positiu d'AAC-IgG (tabla 12).

6.2.2.2.3. INCIDÈNCIA A L'ARTRITIS REUMATOÏDE

Es va determinar el títol d'AAC a 15 malalts afectes d'artritis reumatoïde i en 5 d'ells (33 %) es va detectar un títol positiu d'AAC-IgM (tabla 13).

Tabla 11.- Incidència dels AAC a l'esclerosi sistèmica progressiva

Malalta	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	-

Tabla 12.- Incidència dels AAC a la dermatomiositis-polimiositis

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	-

Tabla 13.- Incidència dels AAC a l'artritis reumatoide

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+

6.2.2.2.4. INCIDÈNCIA A L'ARTERITIS DE HORTON

Es van estudiar 24 malalts afectes d'arteritis de Horton i tan sols en 2 casos (8 %) es van obtenir títols positius d'AAC. En tots 2 es tractava de l'isotipus AAC-IgM (tabla 14).

6.2.2.2.5. INCIDÈNCIA A LA CIRROSI BILIAR PRIMÀRIA

Es va determinar el títol d'AAC a 16 malalts diagnosticats de cirrosi biliar primària. En 7 casos (44 %) es va detectar un títol positiu d'aquests anticossos. Tots ells eren de l'isotipus AAC-IgM i en un cas també de l'AAC-IgG. La distribució segons el grau de positivitat es reflecteix a la tabla 15.

6.2.2.2.6. INCIDÈNCIA A LA PÚRPURA TROMBOCITOPÈNICA IDIOPÀTICA

Van ser estudiats 23 malalts diagnosticats de púrpura trombocitopènica idiopàtica i només en 2 d'ells (9 %) es va detectar un títol positiu d'AAC. Tots 2 eren de l'isotipus AAC-IgG (tabla 16).

Tabla 14.- Incidència dels AAC a l'arteritis de Horton

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	-	+
2	-	+

Tabla 15.- Incidència dels AAC a la cirrosi biliar primària

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+

Tabla 16.- Incidència a la púrpura trombocitopènica idiopàtica

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	-
2	+	-

6.2.3. ASSOCIACIONS DELS ANTICOSSOS ANTICARDIOLIPINA AMB MANIFESTACIONS CLÍNiques I BIOLÒGiques DEL L.E.S.

Han estat estudiades les possibles associacions dels AAC amb subgrups clinico-biològics del LES (malalts amb trombosis, trombocitopènia, etc.) (6.2.3.1), amb altres AAF determinats per tècniques indirectes clàssiques (AL i SLFP) (6.2.3.2) i amb altres marcadors immunològics (Ac anti-ADNn, Ac anti-ENA i factors del complement) (6.2.3.3).

6.2.3.1. ASSOCIACIONS AMB SUBGRUPS CLINICO-BIOLÒGICS

6.2.3.1.1. ASSOCIACIÓ AMB TROMBOSIS

Durant els dos anys de l'estudi es van observar fenòmens trombòtics en 10 malalts, el que representa una incidència del 10 % (tabla 17). En 7 d'ells es va trobar un títol positiu d'AAC (70 %). Dels 36 malalts amb AAC, el 19 % va presentar trombosis, mentre que dels 64 malalts sense AAC només en va presentar el 5 %. La diferència entre ambdós grups és, doncs, del 14 % ($p = 0,04$) i el seu interval de confiança al 95 % va del 7 % al 21 % (fig. 8). El risc relatiu de presentar trombosis del grup amb títol positiu d'AAC és 4,1 vegades superior al del grup sense AAC i la raó de raons és de 4,9.

Tabla 17.- Isotipus dels AAC en els 10 malalts amb fenòmens trombòtics

Malalts	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	-
2	+	+
3	+	-
4	+	+
5	-	-
6	-	-
7	+	-
8	+	-
9	+	+
10	-	-

AAC-TROMBOSIS

$p = 0,04$

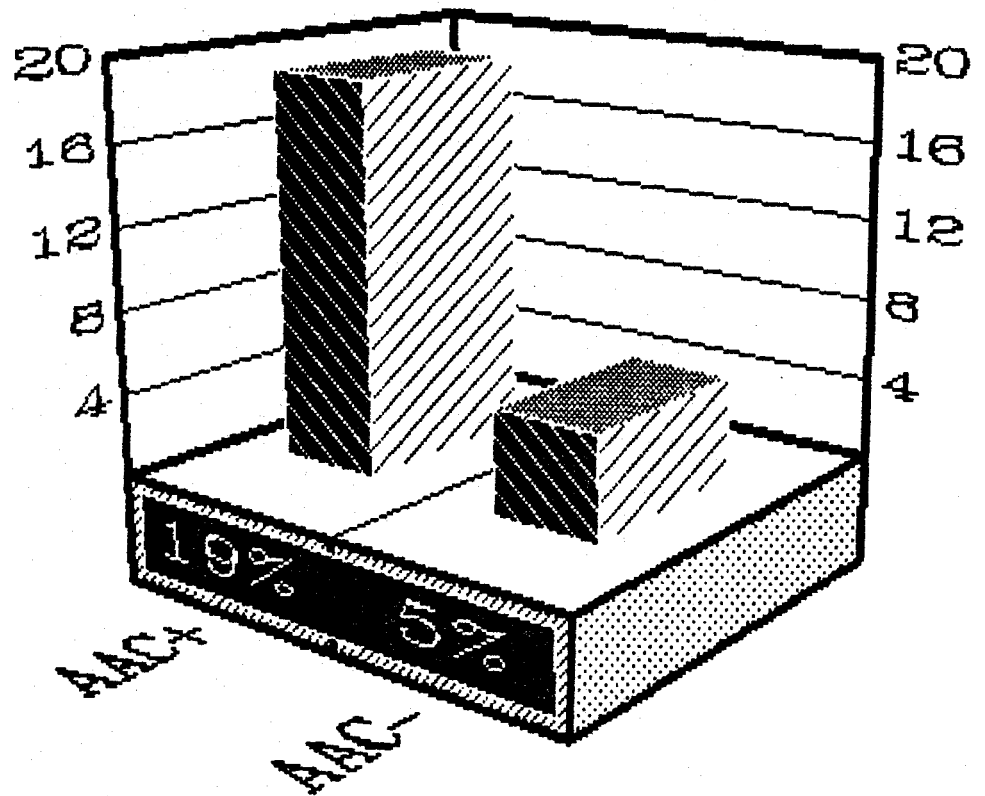


Figura B.- Relació dels AAC amb trombosis.

La diferència entre ambdós grups va ser més gran en analitzar per separat l'isotipus AAC-IgG. Dels 24 malalts amb AAC-IgG, el 29 % va presentar trombosis, mentre que dels 76 malalts sense AAC-IgG només en va presentar el 4 %, és a dir, la diferència va arribar al 25 % ($p = 0,001$), amb un interval de confiança al 95 % del 17 % al 33 % (fig. 9). El risc relatiu de presentar trombosis del grup amb AAC-IgG és 7,3 vegades superior al del grup sense AAC-IgG i la raó de raons de 10,1.

D'altra banda, aquests resultats atorguen als AAC-IgG una sensibilitat en la detecció de trombosis del 70 %, una especificitat del 81 %, un valor de predicció positiva del 29 % i de predicció negativa del 96 % i una eficàcia del 80 %. L'especificitat, valor de predicció positiva i eficàcia en la detecció de trombosis dels AAC-IgG eren més intensos quan es consideraven els títols positius més alts (tabla 18). És de destacar que el valor de predicció positiva va ser més intens quan es consideraven els títols d'AAC-IgG positius alts i va arribar al 67 % quan es van considerar només els positius amb un IU superior a 7,93 U.(fig. 10).

6.2.3.1.2. ASSOCIACIÓ AMB ANTECEDENTS D'AVORTAMENTS

Cap malalta no va patir un avortament espontani al llarg dels 2 anys de l'estudi, per la qual cosa, i a tall d'aproximació, es

AAC-IgG-TROMBOSIS

$p = 0,001$

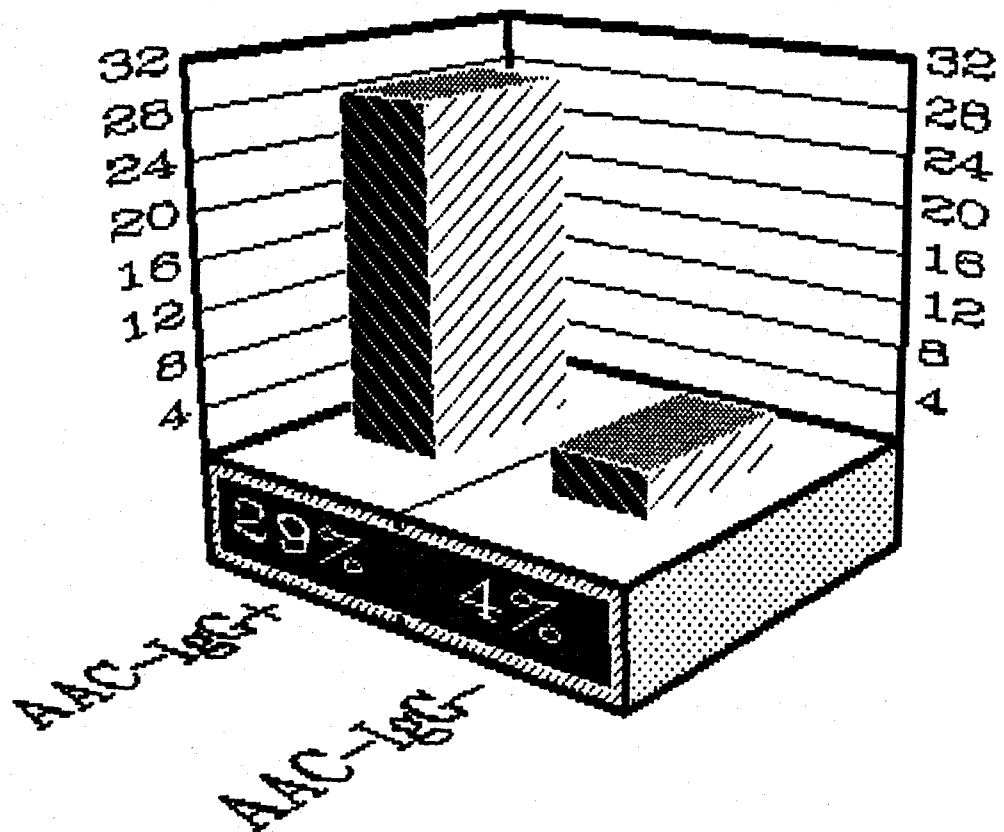


Figura 9.- Relació dels AAC-IgG amb trombosis.

Tabla 18.- Sensibilitat, especificitat, valors de predicció positiva i negativa i eficàcia dels AAC-IgG en la detecció de trombosis

AAC-IgG	S	E	VP+	VP-	Ef
(+)	70 %	81 %	29 %	96 %	80 %
(++)	50 %	89 %	33 %	94 %	85 %
(+++)	20 %	96 %	33 %	91 %	88 %

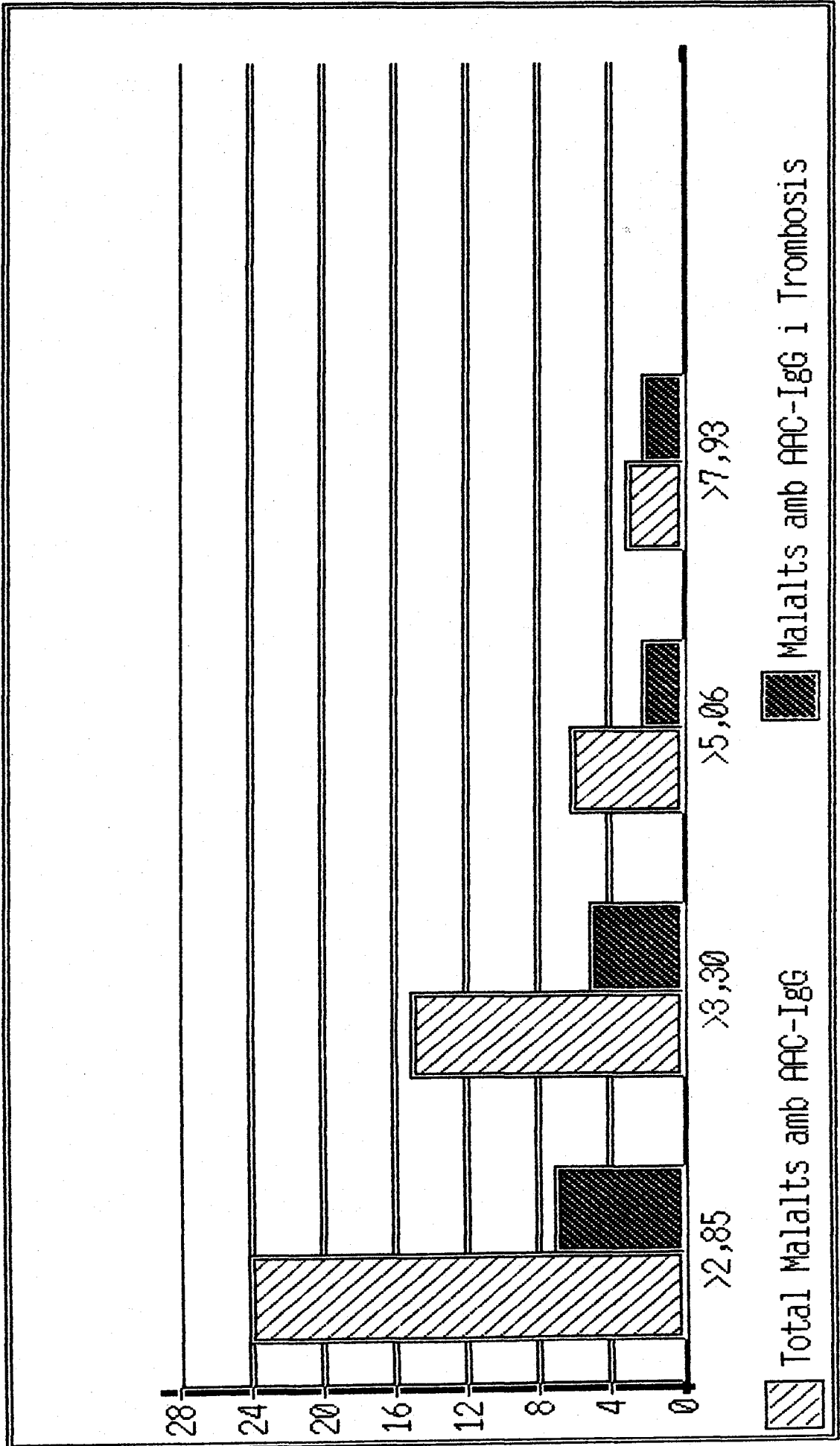


Figura 10.- Valors de predicció positiva dels AAC-IgG com a marcadors de trombosis.

van analitzar les malalties que havien presentat un o més avortaments previs. Així, de les 93 malalties estudiades es va observar que 12 n'havien presentat i que 5 d'elles tenien AAC (42 %)(tabla 19). Tanmateix, de les 35 malalties amb AAC, el 14 % tenien antecedents d'avortaments espontanis i el 12 % de les 58 malalties sense AAC també en tenien, és a dir, la diferència era només del 2 % ($p =$ no significativa)(fig. 11). Tampoc no es va trobar diferència estadísticament significativa en analitzar els isotipus dels AAC per separat.

6.2.3.1.3. ASSOCIACIÓ AMB TROMBOCITOPÈNIA

Durant els 2 anys de l'estudi es va observar trombocitopènia en 17 malalts, el que representa una incidència del 17 % (tabla 20). En 10 d'aquests malalts es va detectar un títol positiu d'AAC (59 %). Dels 36 malalts amb AAC, el 28 % va presentar trombocitopènia, mentre que dels 64 malalts sense AAC només en va presentar l'11 %. La diferència entre ambdós grups és, per tant, del 17 % ($p = 0,05$) i el seu interval de confiança al 95 % va del 10 % al 24 % (fig. 12). El risc relatiu de presentar trombocitopènia del grup amb AAC és 2,5 vegades superior al del grup sense AAC i la raó de raons de 3,1.

Es va observar una major diferència entre ambdós grups en analitzar per separat l'isotipus AAC-IgG. Dels 24 malalts amb AAC-IgG, el 33 % presentava trombocitopènia, mentre que dels 76

Tabla 19.- Isotipus dels AAC en les 12 malalties amb antecedents d'avortaments espontanis

Malalties	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	-
2	+	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	+	-
7	-	+
8	-	+
9	-	-
10	+	+
11	-	-
12	-	-

AAC-AVORTAMENTS

$p = n. s.$

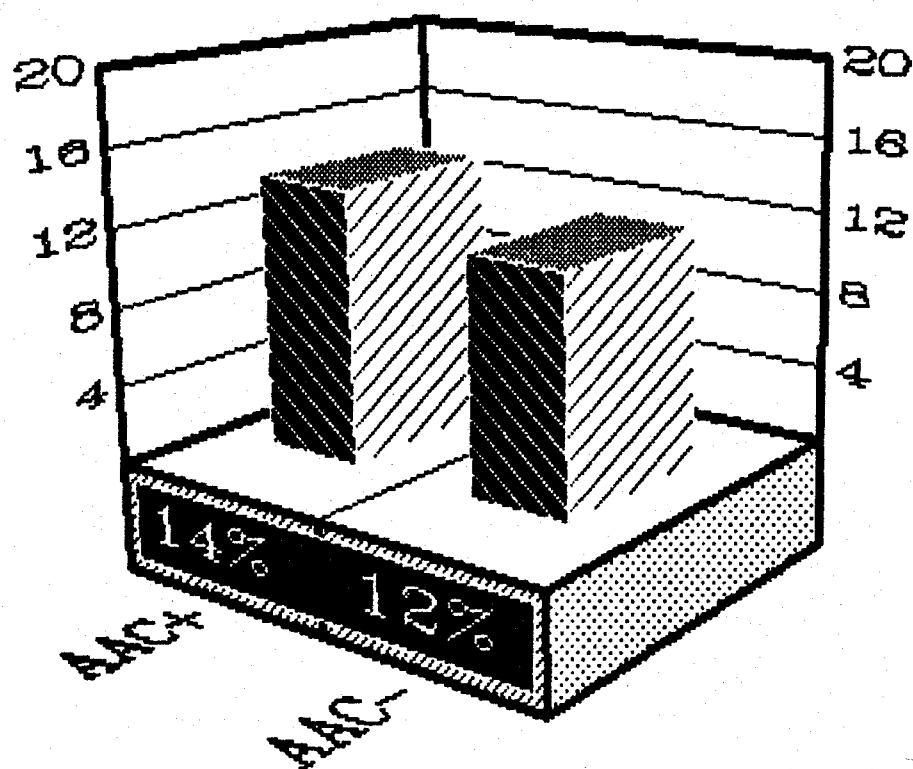


Figura 11.- Relació dels AAC amb antecedents d'avortaments.

Tabla 20.- Isotipus dels AAC en els 17 malalts amb trombocitopènia

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	-	+
2	+	-
3	+	-
4	-	-
5	-	-
6	+	-
7	+	+
8	-	-
9	-	+
10	-	-
11	+	+
12	-	-
13	+	+
14	-	-
15	-	-
16	+	-
17	+	-

AAC-TROMBOCITOPÈNIA

$p = 0,05$

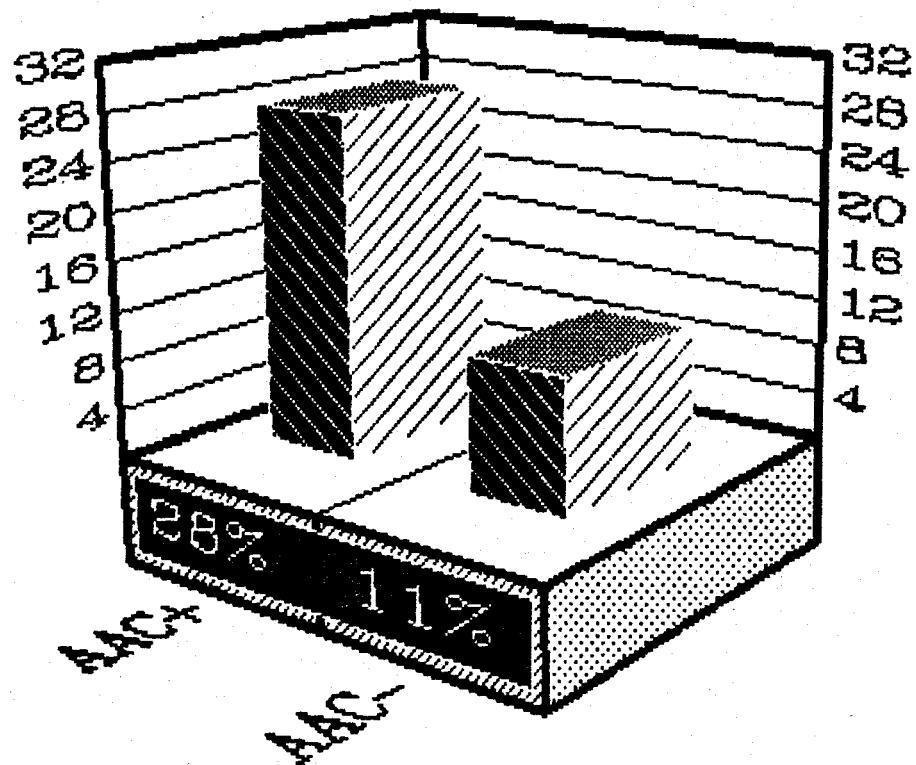


Figura 12.- Relació dels AAC amb trombocitopènia.

malalts sense AAC-IgG només en presentava el 12 %, és a dir, la diferència va arribar al 21 % ($p = 0,03$), amb un interval de confiança al 95 % del 13 % al 29 % (fig. 13). El risc relatiu és en aquest cas de 2,8 i la raó de raons de 3,7.

Per altra part, aquestes dades atorguen als AAC-IgG una sensibilitat en la detecció de trombocitopènia del 47 %, una especificitat del 81 %, un valor de predicció positiva del 33 % i de predicció negativa del 88 % i una eficàcia del 75 %. L'especificitat, valor de predicció positiva i eficàcia en la detecció de trombocitopènia per part dels AAC-IgG eren també més intensos quan es consideraven els títols positius més alts (tabla 21). Tanmateix, es va observar que el valor de predicció positiva arribava al 67 % quan es consideraven només els títols positius amb un IU superior a 7,93 U. (fig. 14).

6.2.3.1.4. ASSOCIACIÓ AMB AFECCIÓ DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Durant l'estudi, les úniques manifestacions clíniques d'afecció del sistema nerviós central van ser l'aparició de migranya en 14 malalts i d'epilepsia en 2 (tabla 22). En 6 d'aquests malalts es va detectar un títol positiu d'AAC (37 %). No es va trobar associació de forma estadísticament significativa entre la presència d'aquestes manifestacions clíniques i l'existència d'AAC (fig. 15).

AAC-IgG-TROMBOCITOPÈNIA

$p = 0,03$

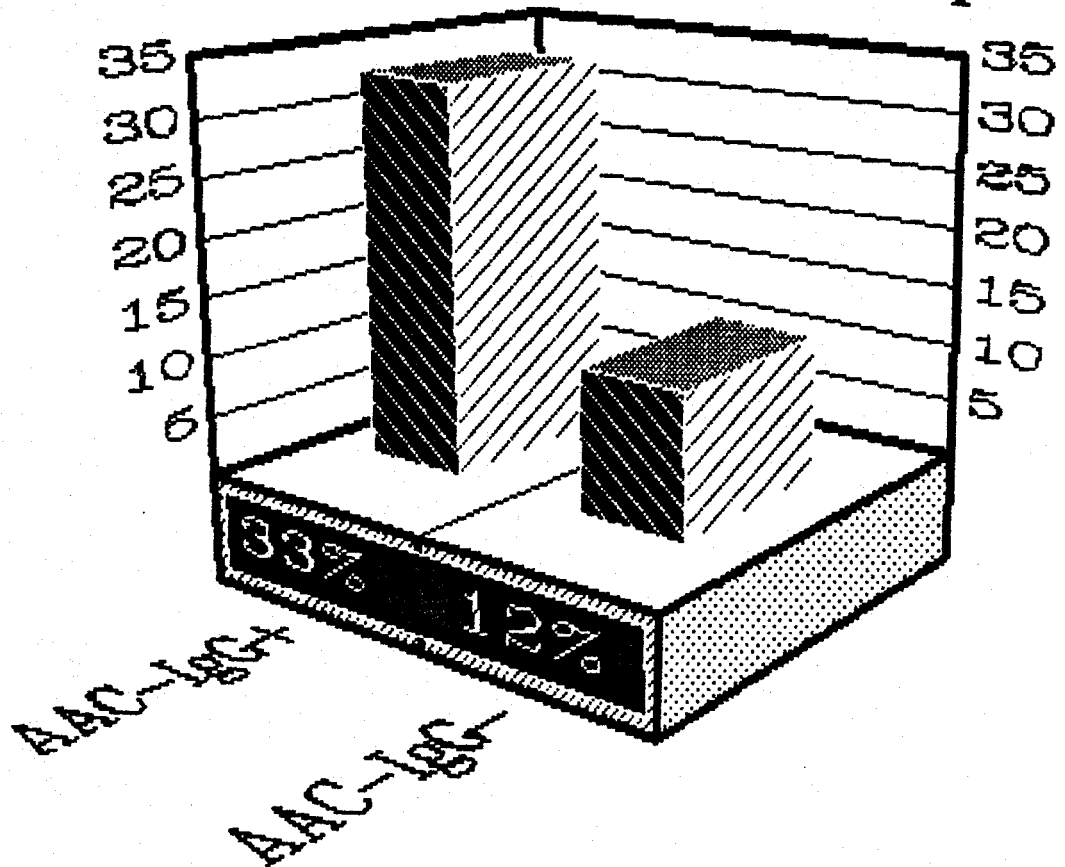


Figura 13.- Relació dels AAC-IgG amb trombocitopènia.

Tabla 21.- Sensibilitat, especificitat, valors de predicció positiva i negativa i eficàcia dels AAC-IgG en la detecció de trombocitopènia

AAC-IgG	S	E	VP+	VP-	Ef
(+)	47 %	81 %	33 %	88 %	75 %
(++)	35 %	89 %	40 %	87 %	80 %
(+++)	18 %	96 %	50 %	85 %	83 %

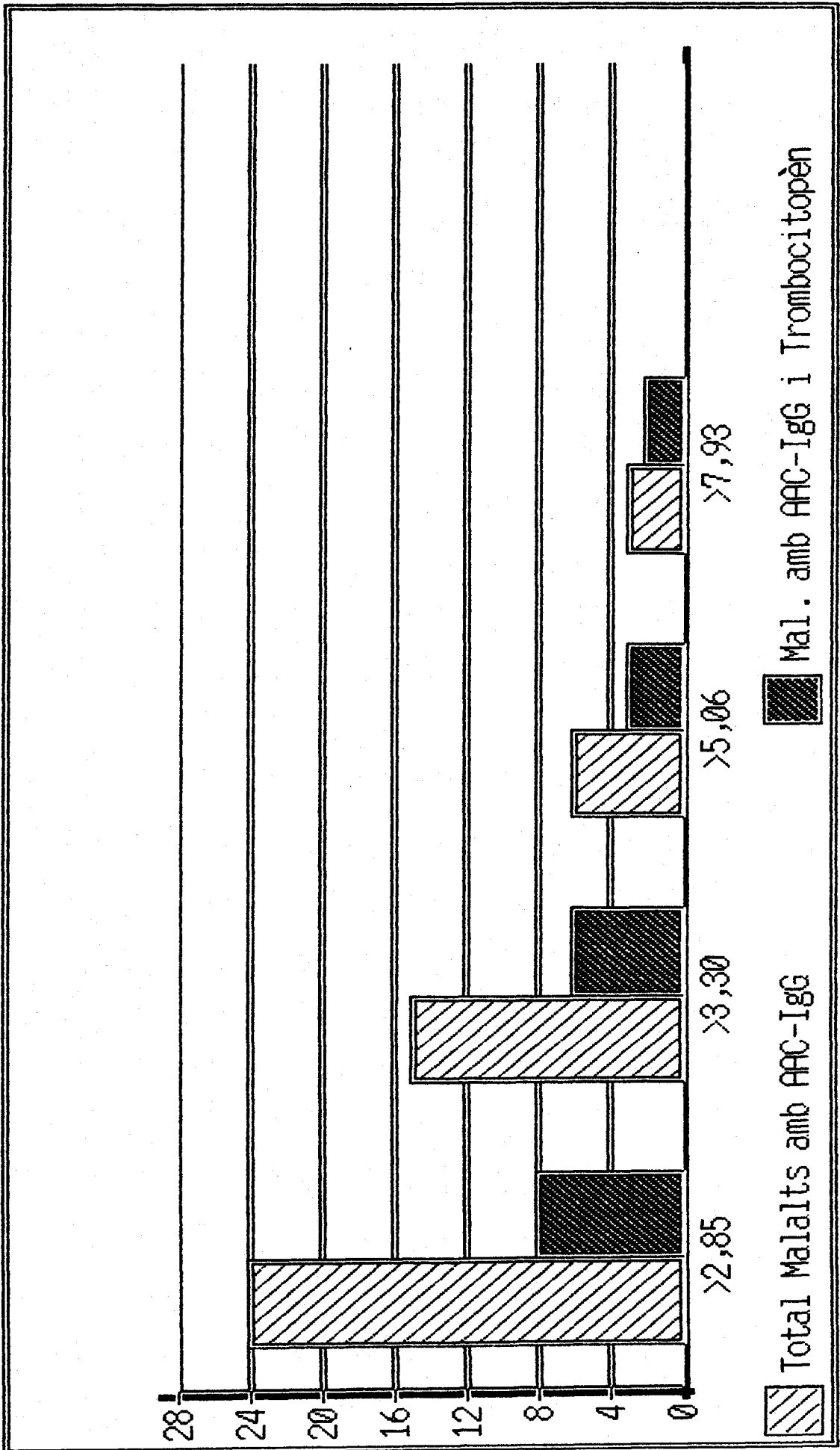


Figura 14.- Valors de predicció positiva dels AAC-IgG com a marcadors de trombocitopènia.

Tabla 22.- Isotipus dels AAC en els 16 malalts amb afecció del sistema nerviós central

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	-
2	-	-
3	-	-
4	+	-
5	-	+
6	-	-
7	-	+
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	+
14	-	-
15	-	-
16	-	-

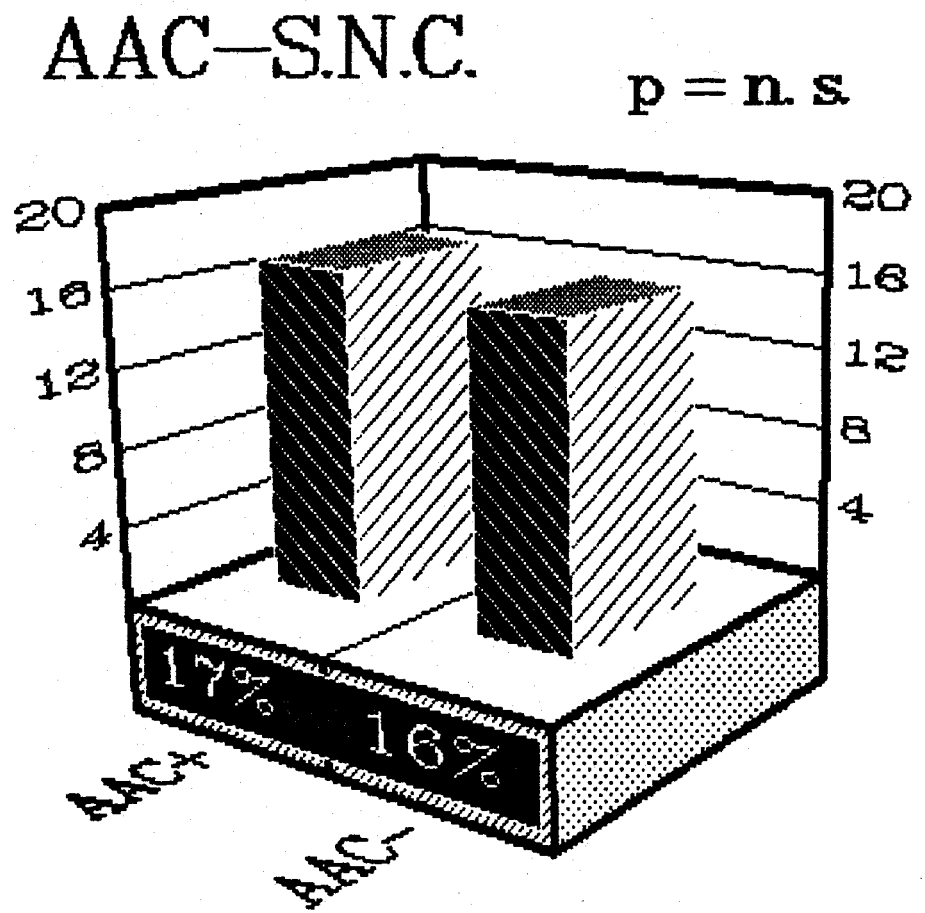


Figura 15.- Relació dels AAC amb afecció del sistema nerviós central.

6.2.3.1.5. ASSOCIACIÓ AMB ALTRES SUBGRUPS CLÍNICO-BIOLÒGICS

Dels 33 malalts amb afecció renal, 16 presentaven un títol positiu d'AAC (48 %). No existia associació estadísticament significativa entre la presència de nefropatia de qualsevol tipus anatomopatològic i l'existència d'AAC.

Durant els 2 anys de l'estudi, 16 malalts van presentar artritis i en 7 d'ells (44 %) es va detectar un títol positiu d'AAC. Manifestacions dermatològiques van aparèixer en 7 malalts i en 4 d'ells (57 %) es van detectar AAC. Serositis (pleuritis i/o pericarditis) es van observar en 5 malalts, 3 dels quals (60 %) presentaven AAC. Vasculitis i fenomen de Raynaud van detectar-se en 4 malalts i 2 d'ells (50 %) tenien també AAC. No es va trobar associació estadísticament significativa entre l'aparició de cap d'aquestes manifestacions clíniques i l'existència de títols positius d'AAC (tabla 23).

Nou malalts (9 %) de la sèrie van presentar anèmia hemolítica autoimmune amb prova de Coombs positiva (tabla 24). En 6 d'ells es va objectivar un títol positiu d'AAC (67 %) i 5 d'aquests eren de l'isotipus AAC-IgM. Tanmateix, dels 20 malalts amb AAC-IgM, el 25 % va presentar anèmia hemolítica, mentre que dels 80 malalts sense AAC-IgM només en va presentar el 5 %. La diferència entre ambdós grups és, per tant, del 20 % ($p = 0,01$) i el seu interval de confiança al 95 % va del 12 % al 28 % (fig. 16). El risc relatiu de presentar anèmia hemolítica del grup amb títol positiu d'AAC-

Tabla 23.- Incidència dels AAC a diverses manifestacions clíniques del LES

Manifestació	AAC + (%)	AAC - (%)	p
Trombosis	7 (19 %)	3 (5 %)	0,04
Trombocitopènia	10 (28 %)	7 (11 %)	0,05
Avortaments previs	5 (14 %)	7 (11 %)	n.s.
Afecció del SNC	6 (17 %)	10 (16 %)	n.s.
Nefropatia	16 (44 %)	17 (27 %)	n.s.
Artritis	7 (19 %)	9 (14 %)	n.s.
Afecció cutània	4 (11 %)	3 (5 %)	n.s.
Serositis	3 (8 %)	2 (3 %)	n.s.
Vasculitis	2 (6 %)	2 (3 %)	n.s.

Tabla 24.- Isotipus dels AAC en els 9 malalts amb anèmia hemolítica

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-
5	-	-
6	-	+
7	-	-
8	+	+
9	+	+

AAC-IgM-ANÈM. HEMOL.

$p = 0,01$

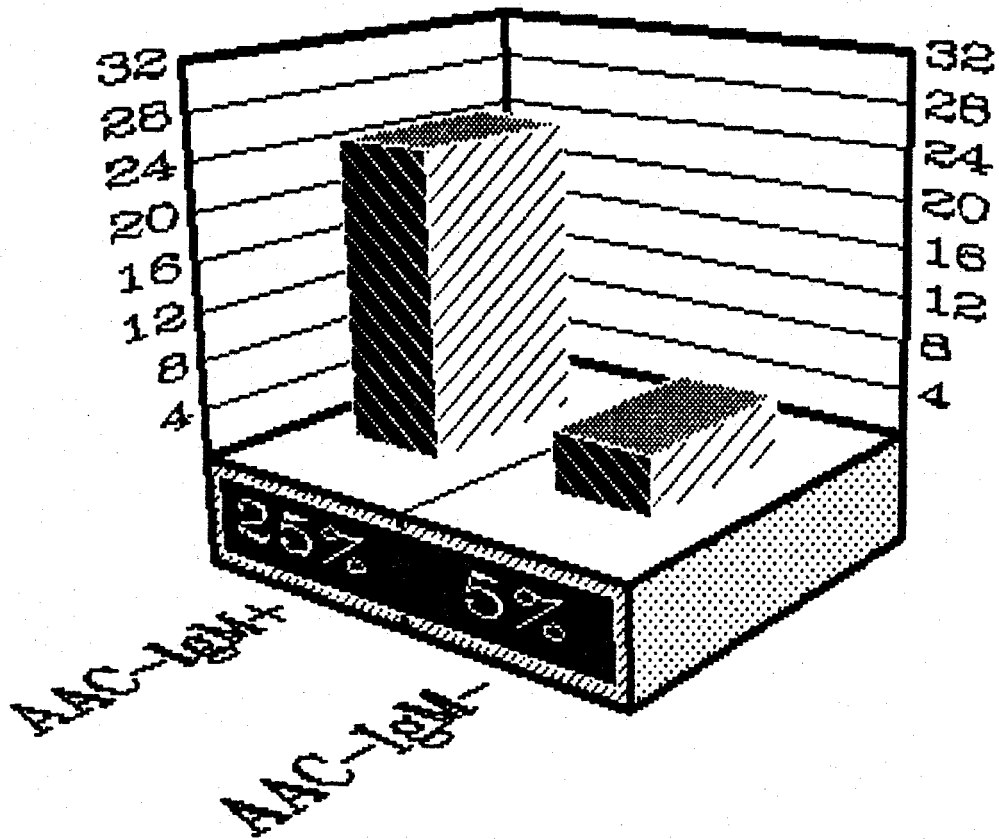


Figura 16.- Relació dels AAC-IgM amb anèmia hemolítica.

IgM és 5 vegades superior al del grup sense AAC-IgM i la raó de raons de 6,3. Això atorga als AAC-IgM una sensibilitat del 56 %, una especificitat del 84 %, un valor de predicció positiva del 25 % i de predicció negativa del 95 % i una eficàcia del 81 %. L'especificitat, valor de predicció positiva i eficàcia en la detecció d'anèmia hemolítica per part dels AAC-IgM van ser més intensos quan es van considerar els títols positius més alts (tabla 25). Menció especial requereix el fet que el valor de predicció positiva va ser del 60 % quan es consideraven els títols d'AAC-IgM amb un IU superior a 11 U. i del 100 % quan era superior a 15 U. (fig. 17).

Durant l'estudi, 5 malalts van presentar neutropènia i 4 d'ells (80 %) tenien un títol positiu d'AAC, concretament de l'isotipus AAC-IgM (tabla 26). Dels 20 malalts amb AAC-IgM, el 20 % presentava neutropènia, mentre que dels 80 sense AAC-IgM només en presentava l'1 %.. La diferència entre ambdós grups és, doncs, del 19 % ($p = 0,005$) i el seu interval de confiança al 95 % va de l'11 % al 27 % (fig. 18). El risc relatiu de presentar neutropènia del grup amb AAC-IgM és 16 vegades superior al del grup sense AAC-IgM i la raó de raons de 19,7. Això atorga als AAC-IgM una sensibilitat del 80 %, una especificitat del 83 %, un valor de predicció positiva del 20 % i de predicció negativa del 99 % i una eficàcia del 83 %. L'especificitat, valor de predicció positiva i eficàcia en la detecció de neutropènia per part dels AAC-IgM també van ser més intensos quan es van considerar els títols positius més alts (tabla 27). És de destacar

Tabla 25.- Sensibilitat, especificitat, valors de predicció positiva i negativa i eficàcia dels AAC-IgM en la detecció d'anèmia hemolítica

AAC-IgM	S	E	VP+	VP-	Ef
(+)	56 %	84 %	25 %	95 %	81 %
(++)	44 %	88 %	27 %	94 %	84 %
(+++)	44 %	90 %	31 %	94 %	86 %

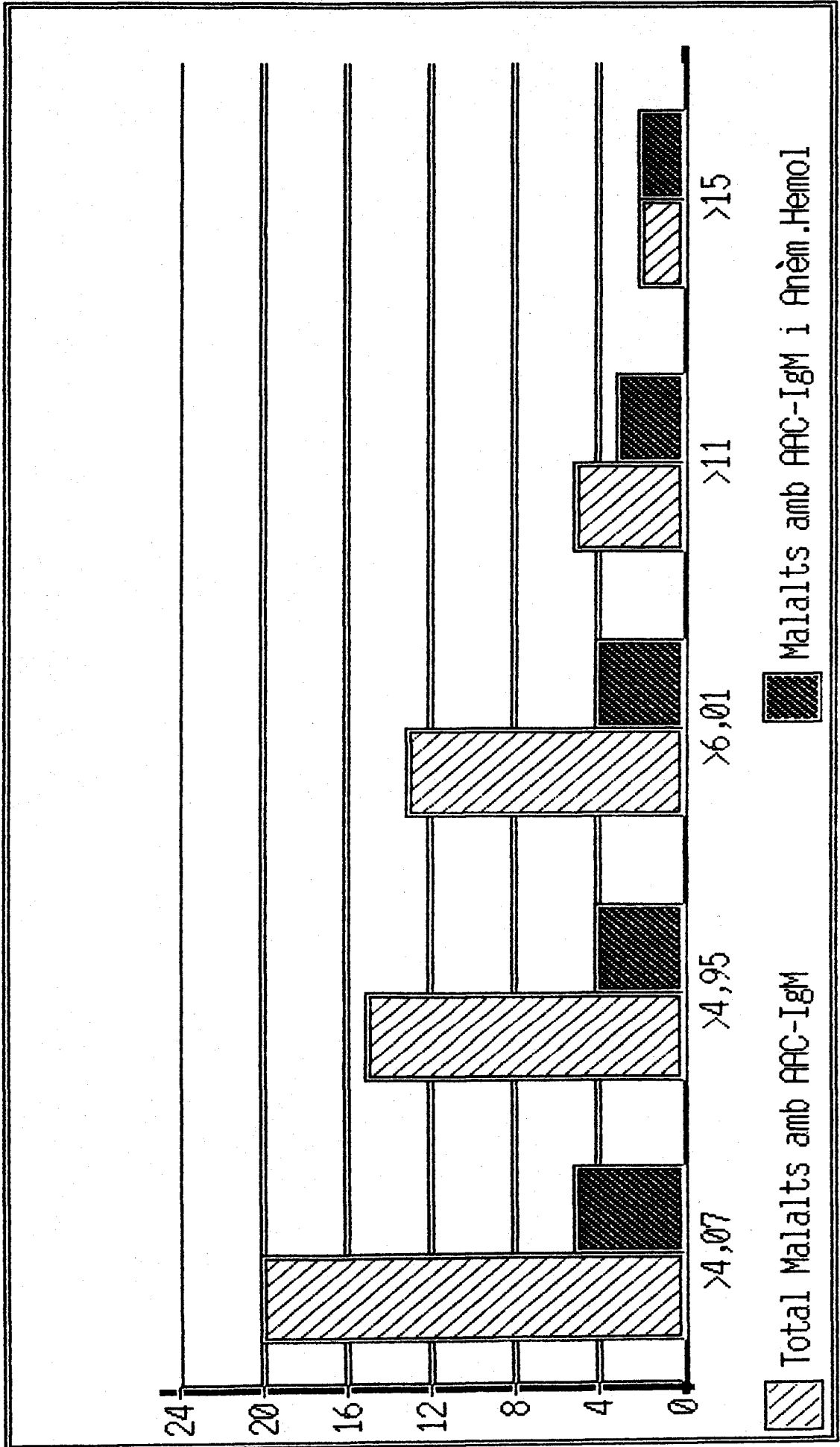


Figura 17.- Valor de predicció positiva dels AAC-IgM com a marcadors d'anèmia hemolítica.

Tabla 26.- Isotipus dels AAC en els 5 malalts amb neutropènia

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	-	+
2	-	+
3	-	-
4	-	+
5	-	+

AAC-IgM-NEUTROPÈNIA

p = 0,005

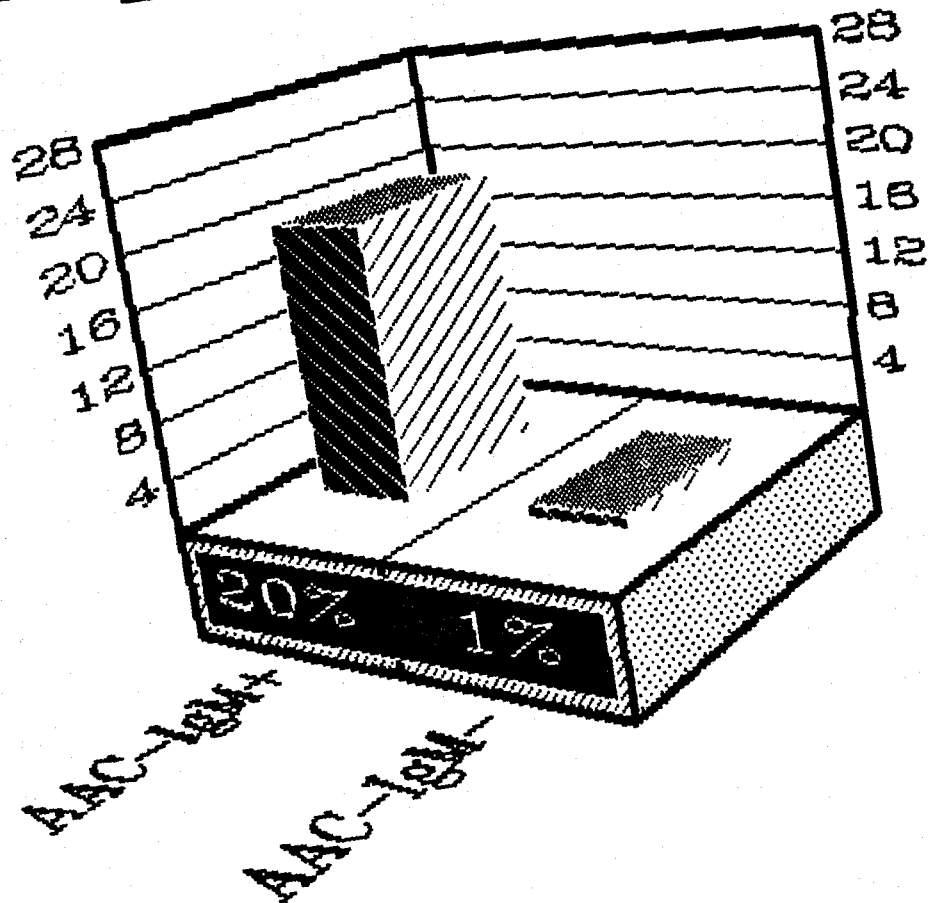


Figura 18.- Relació dels AAC-IgM amb neutropènia.

Tabla 27.- Sensibilitat, especificitat, valors de predicció positiva i negativa i eficàcia dels AAC-IgM en la detecció de neutropènia

AAC-IgM	S	E	VP+	VP-	Ef
(+)	80 %	83 %	20 %	99 %	83 %
(++)	60 %	87 %	20 %	98 %	86 %
(+++)	60 %	89 %	23 %	98 %	88 %

que el valor de predicció positiva va arribar al 40 % quan es van considerar els títols d'AAC-IgM amb un IU superior a 11 U. i del 50 % quan era superior a 15 U. (fig. 19).

Es va objectivar limfopènia en 25 malalts de la sèrie i només el 28 % presentava AAC. No es va trobar associació estadísticament significativa entre limfopènia i presència d'AAC.

Finalment, mitjançant l'anàlisi multivariada es va confirmar l'existència d'associació entre els AAC i la presència de trombosis ($p = 0,004$), neutropènia ($p = 0,009$), trombocitopènia ($p = 0,02$) i anèmia hemolítica ($p = 0,05$). Per isotipus, els AAC-IgG estaven associats a trombosis ($p = 0,001$) i trombocitopènia ($p = 0,03$) i els AAC-IgM a neutropènia ($p = 0,01$) i anèmia hemolítica ($p = 0,015$).

6.2.3.1.6. ASSOCIACIÓ AMB ACTIVITAT CLÍNICA

Es va constatar activitat clínica del LES en 40 malalts (40 %) i en 21 d'ells es va detectar la presència d'AAC (52 %). Dels 36 malalts amb AAC, el 58 % es trobava en activitat clínica, mentre que dels 64 sense AAC, només s'hi trobava el 30 %. La diferència entre ambdós grups és, per tant, del 28 % ($p = 0,01$) i el seu interval de confiança al 95 % va del 19 % al 37 % (fig. 20). El risc relatiu de presentar activitat clínica del grup amb AAC és 2 vegades superior al del grup sense AAC i la raó de raons

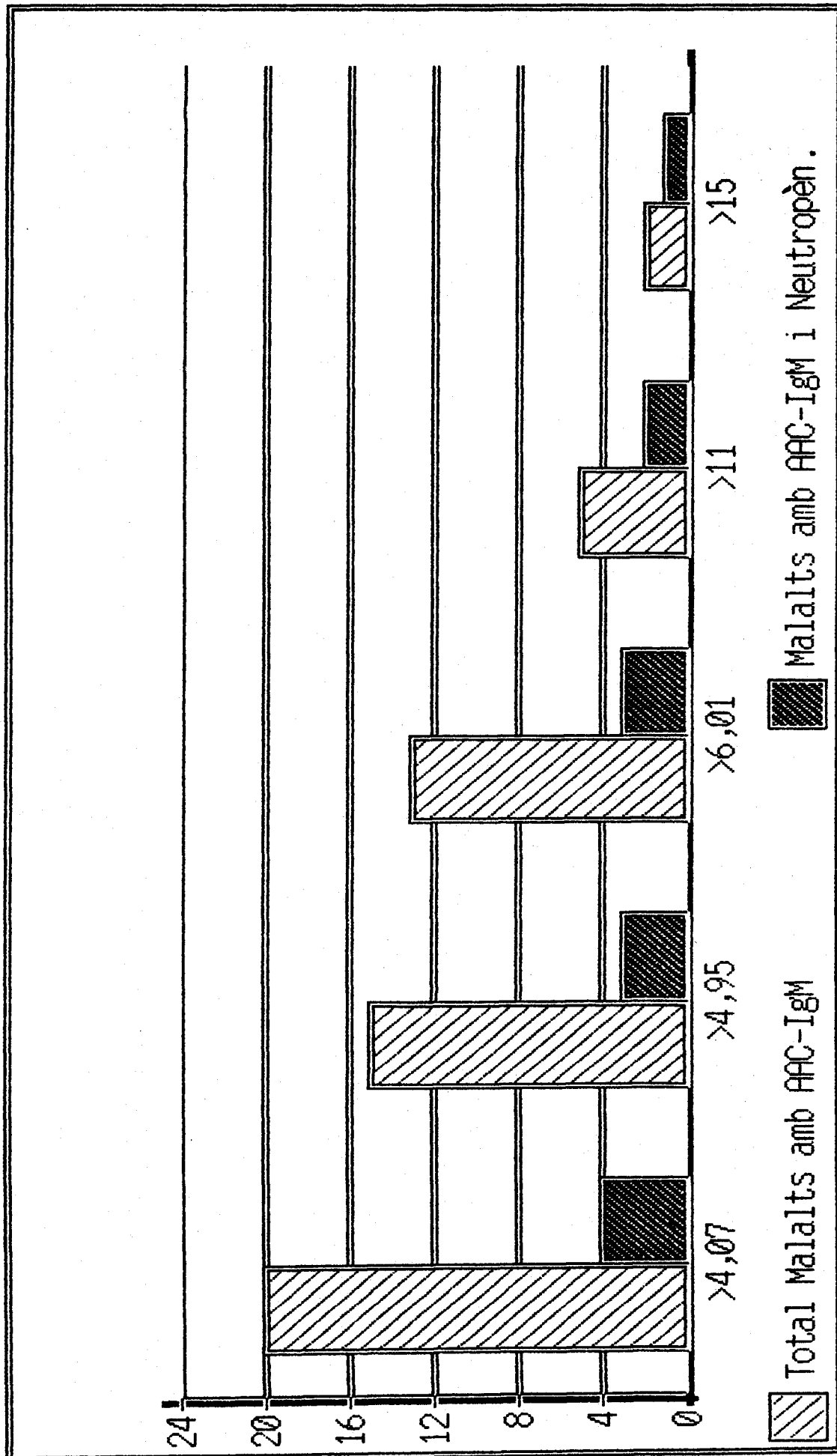


Figura 19.- Valor de predicció positiva dels AAC-IgM com a marcadors de neutropènia.

AAC-ACTIVITAT L.E.S.

p = 0,01

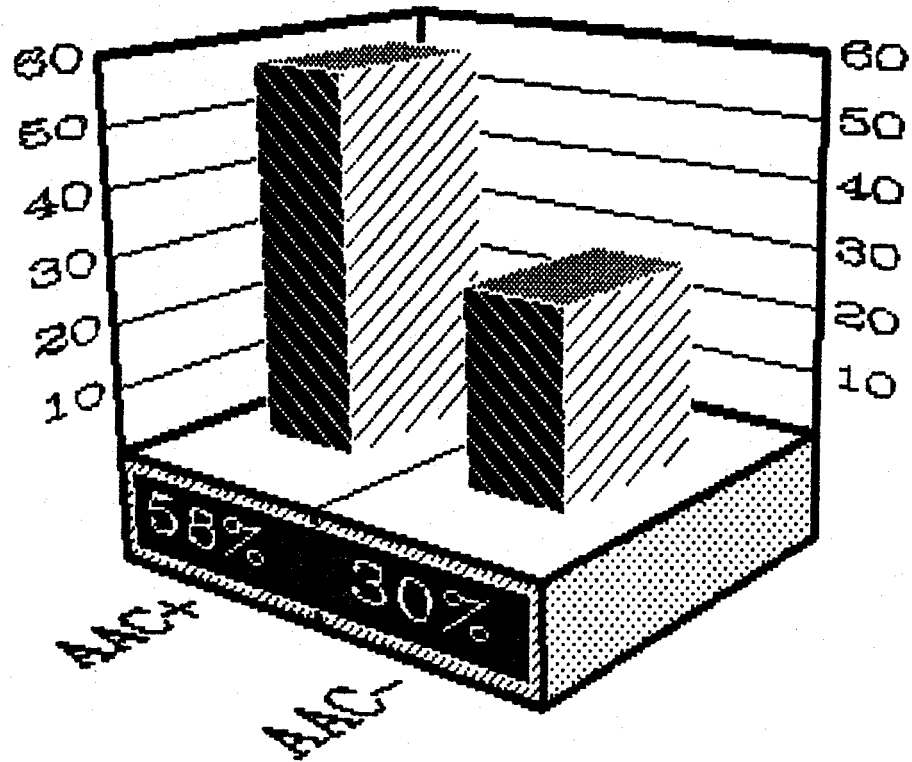


Figura 20.- Relació dels AAC amb l'activitat clínica del LES.

de 3,3. Això atorga als AAC una sensibilitat en la detecció d'activitat clínica del 52 %, una especificitat del 75 %, un valor de predicció positiva del 58 % i de predicció negativa del 70 % i una eficàcia del 66 %.

En analitzar per separat l'isotipus AAC-IgG, s'observa que el 40 % dels malalts en activitat presenten un títol positiu d'aquest isotipus. Tanmateix, dels 24 malalts amb AAC-IgG, el 67 % es trobava en activitat clínica, mentre que dels 76 sense aquest isotipus només s'hi trobava el 32 %. La diferència entre ambdós grups és ara del 35 % ($p = 0,005$) i el seu interval de confiança al 95 % va del 26 % al 44 % (fig. 21). El risc relatiu és 2 i la raó de raons 4,3. Això atorga a l'isotipus AAC-IgG una sensibilitat en la detecció d'activitat clínica del 40 %, una especificitat del 87 %, un valor de predicció positiva del 67 % i de predicció negativa del 68 % i una eficàcia del 68 %. A la tabla 28 es poden comparar aquests resultats amb els trobats amb altres marcadors d'activitat per Font et al. (462) en un grup de 150 malalts lúpics, molts dels quals inclosos en la present sèrie.

Si s'exclouen de la sèrie els 24 malalts que presenten trombocitopènia i/o anèmia hemolítica (criteris d'activitat clínica), es pot constatar que tenen un títol positiu d'AAC 9 dels 21 malalts en activitat restants (43 %). Tanmateix, dels 22 malalts restants amb AAC, el 41 % es troba en activitat, mentre que dels 54 sense AAC s'hi troba el 22 % ($p =$ no significativa).

AAC-IgG-ACTIVITAT L.E.S.

$p = 0,005$

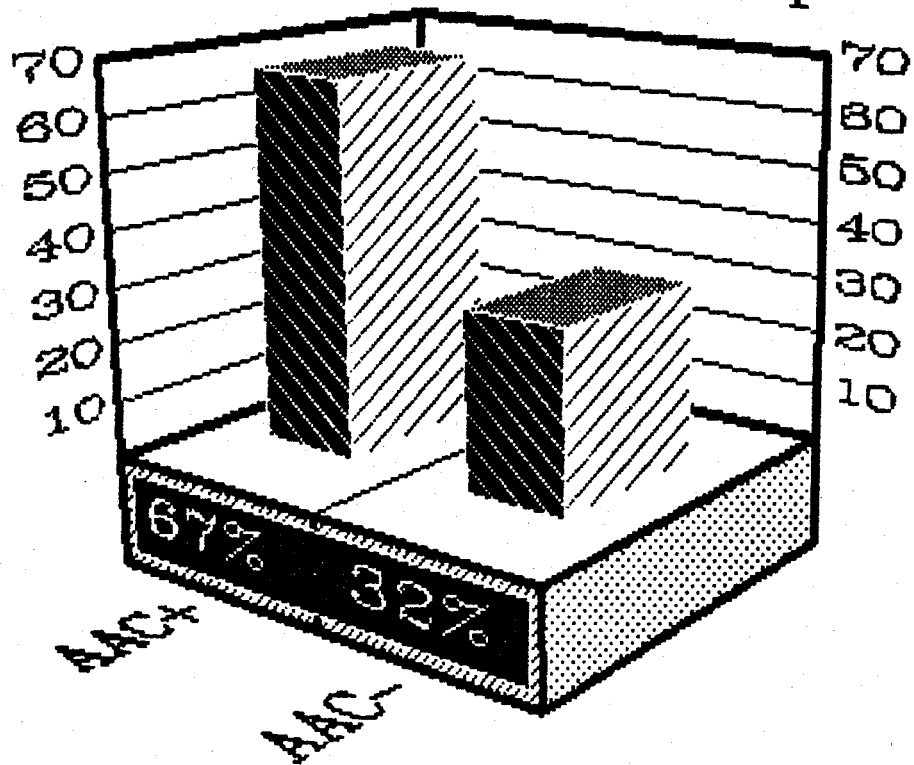


Figura 21.- Relació dels AAC-IgG amb l'activitat clínica del LES.

Tabla 28.- Sensibilitat, especificitat i eficàcia
en la detecció d'activitat clínica de diversos
paràmetres immunològics

	AAC-IgG	Ac ADNn	C ₃	C ₄	CH50	CIC
Sensibilitat	40 %	50 %	42 %	36 %	38 %	39 %
Especificitat	87 %	70 %	71 %	82 %	84 %	78 %
Eficàcia	68 %	60 %	59 %	63 %	66 %	64 %

Tanmateix, en estudiar l'activitat clínica en relació a trombocitopènia, anèmia hemolítica i AAC, mitjançant l'anàlisi multivariada, es comprova que l'activitat es relaciona en primer lloc amb trombocitopènia ($p = 0,001$), mentre que la relació amb els AAC no és estadísticament significativa.

6.2.3.2. ASSOCIACIONS AMB ALTRES ANTICOSSOS ANTIFOSFOLÍPIDS

6.2.3.2.1. ASSOCIACIÓ AMB L'ANTICOAGULANT LÚPIC

Es va estudiar la possible presència d'AL en 66 malalts de la sèrie i es va detectar en 30 casos (45 %)(tabla 29). La distribució segons la positivitat de les diferents proves coagulomètriques practicades és a la figura 22. Dels 24 malalts estudiats aquí amb un títol positiu d'AAC, el 67 % tenien AL, mentre que dels 42 sense AAC només en tenien el 33 %. La diferència entre ambdós grups és, per tant, del 34 % ($p = 0,01$) i el seu interval de confiança al 95 % va del 25 % al 43 % (fig. 23).

6.2.3.2.2. ASSOCIACIÓ AMB LA SEROLOGIA LUÈTICA FALSAMENT POSITIVA

Es va estudiar també la presència de SLFP en els 100 malalts de la sèrie i es va detectar en 17 casos (17 %). Dels 36 malalts amb un títol positiu d'AAC, el 25 % tenien SLFP, mentre que dels

Tabla 29.- Isotipus dels AAC en els 30 malalts amb AL

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
1	-	-
2	+	+
3	+	-
4	+	+
5	-	+
6	-	-
7	+	-
8	+	+
9	+	-
10	-	+
11	+	+
12	-	-
13	-	-
14	+	-
15	-	-
16	-	+
17	-	-
18	+	-
19	-	-
20	-	-
21	+	-
22	-	-
23	+	+
24	-	-

Tabla 29.- (continuació)

Malalt	AAC-IgG	AAC-IgM
25	-	-
26	-	-
27	+	+
28	-	-
29	-	-
30	+	-

ANTICOAGULANT LÚPIC

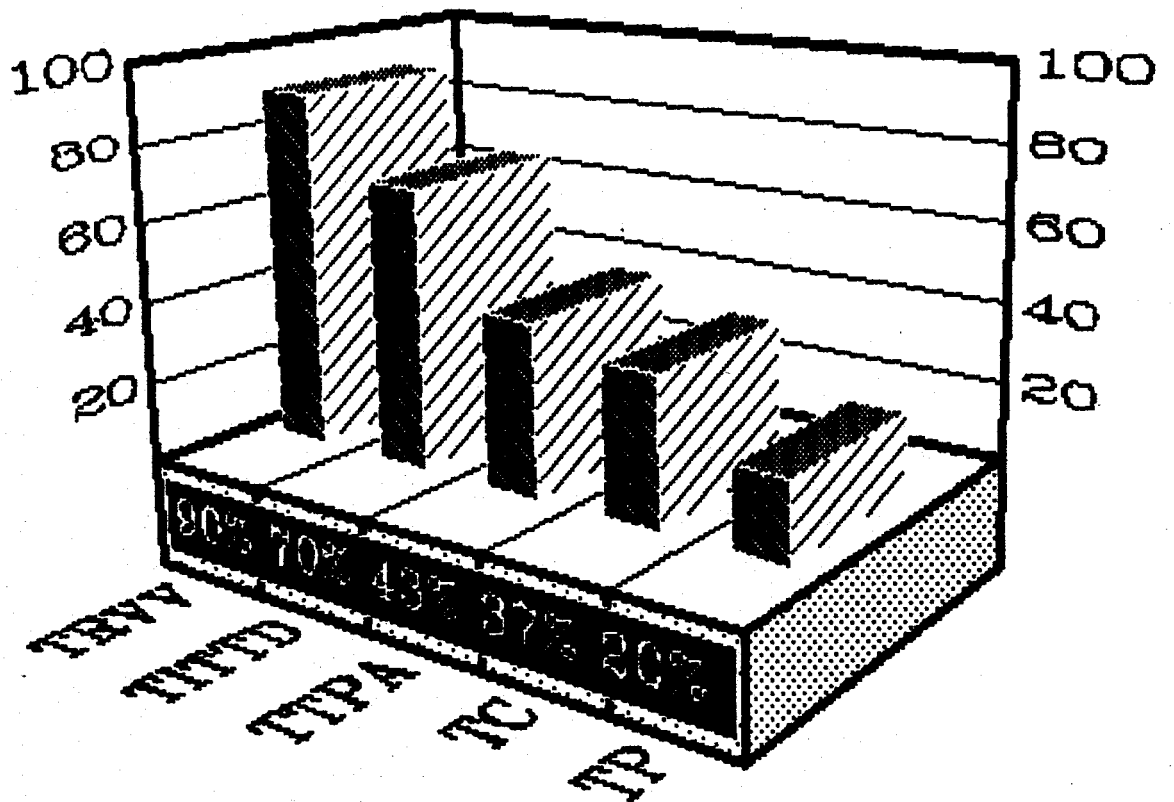


Figura 22.- Sensibilitat de les diferents proves coagulomètriques utilitzades en la detecció de l'AL.

AAC-AL

$p = 0,01$

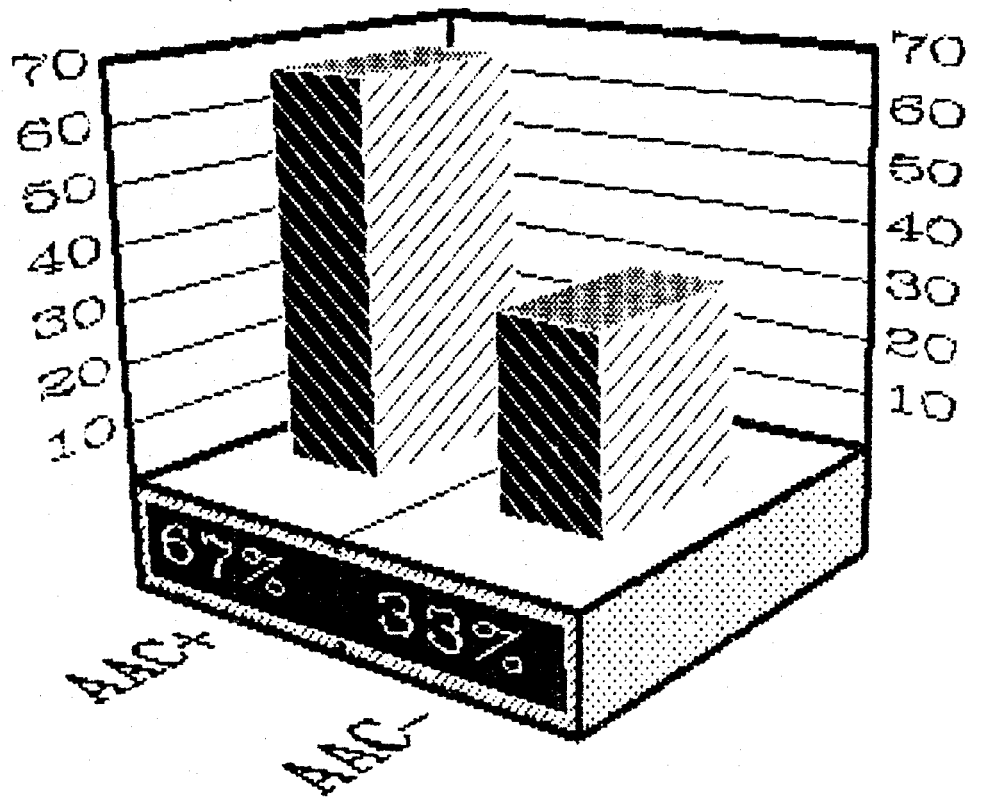


Figura 23.- Relació dels AAC amb l'AL.

64 sense AAC en tenien el 12,5 %, és a dir, la diferència era del 12,5 % ($p =$ no significativa).

6.2.3.3. ASSOCIACIONS AMB ALTRES MARCADORS IMMUNOLÒGICS

6.2.3.3.1. ASSOCIACIÓ AMB ELS ANTICOSSOS ANTI-ADN MADIU

Es va detectar un títol elevat d'Ac anti-ADNn en 53 malalts (53 %), dels quals 25 (47 %) tenien també un títol positiu d'AAC. Dels 36 malalts de la sèrie amb un títol positiu d'AAC, el 69 % presentava un títol elevat d'Ac anti-ADNn, mentre que dels 64 sense AAC només el presentava el 44 %. La diferència entre ambdós grups és, per tant, del 15 % ($p = 0,05$) i el seu interval de confiança al 95 % va de l'11 % al 19 % (fig. 24).

La mitjana de la xifra d'Ac anti-ADNn era de 52,33 mU/ml (DE = 38,61 mU/ml) en el grup de malalts amb un títol positiu d'AAC i de 37,33 mU/ml (DE = 36,11 mU/ml) en els malalts amb un títol negatiu ($p = 0,05$). Tanmateix, es va observar una correlació linial entre el títol d'AAC i el d'Ac anti-ADNn ($r = 0,2393$, $p < 0,05$) (fig. 25).

AAC-AcADNn $p < 0.05$

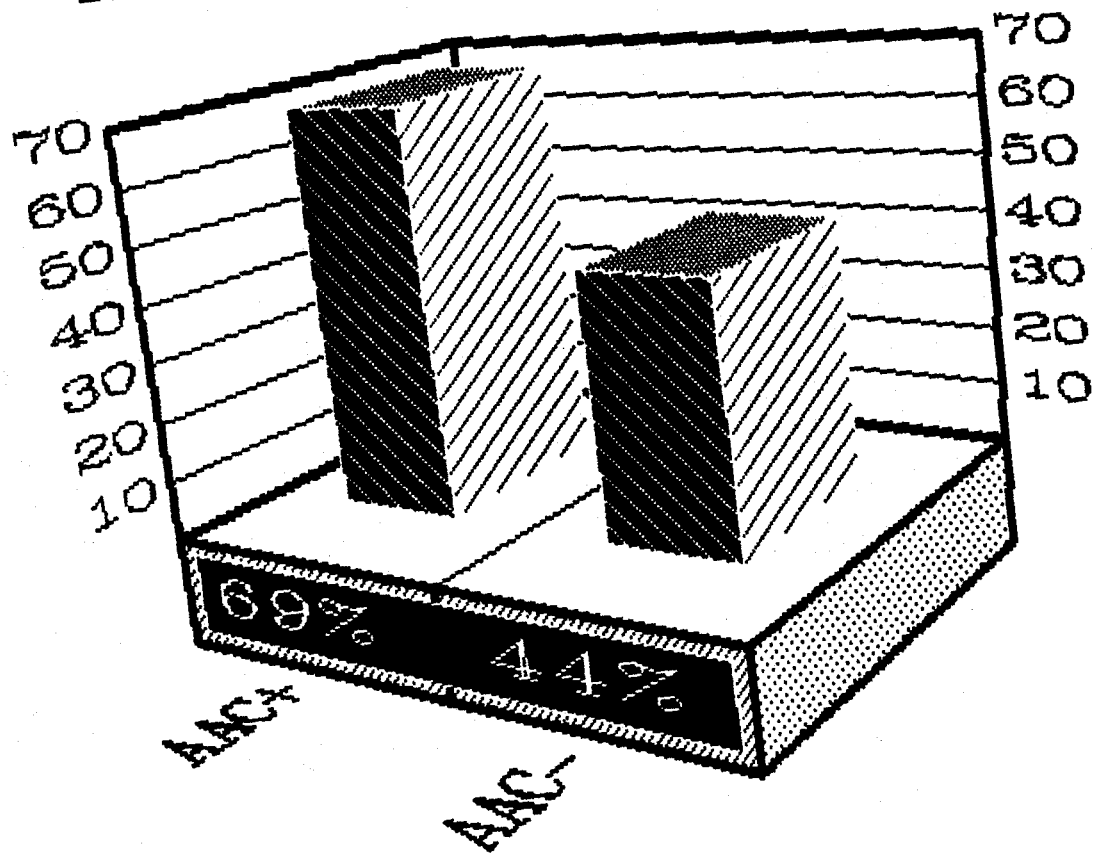


Figura 24.- Relació dels AAC-IgG amb els anticossos anti-ADNn.

AAC-ACADNn

R = 0,23935

P < 0,05

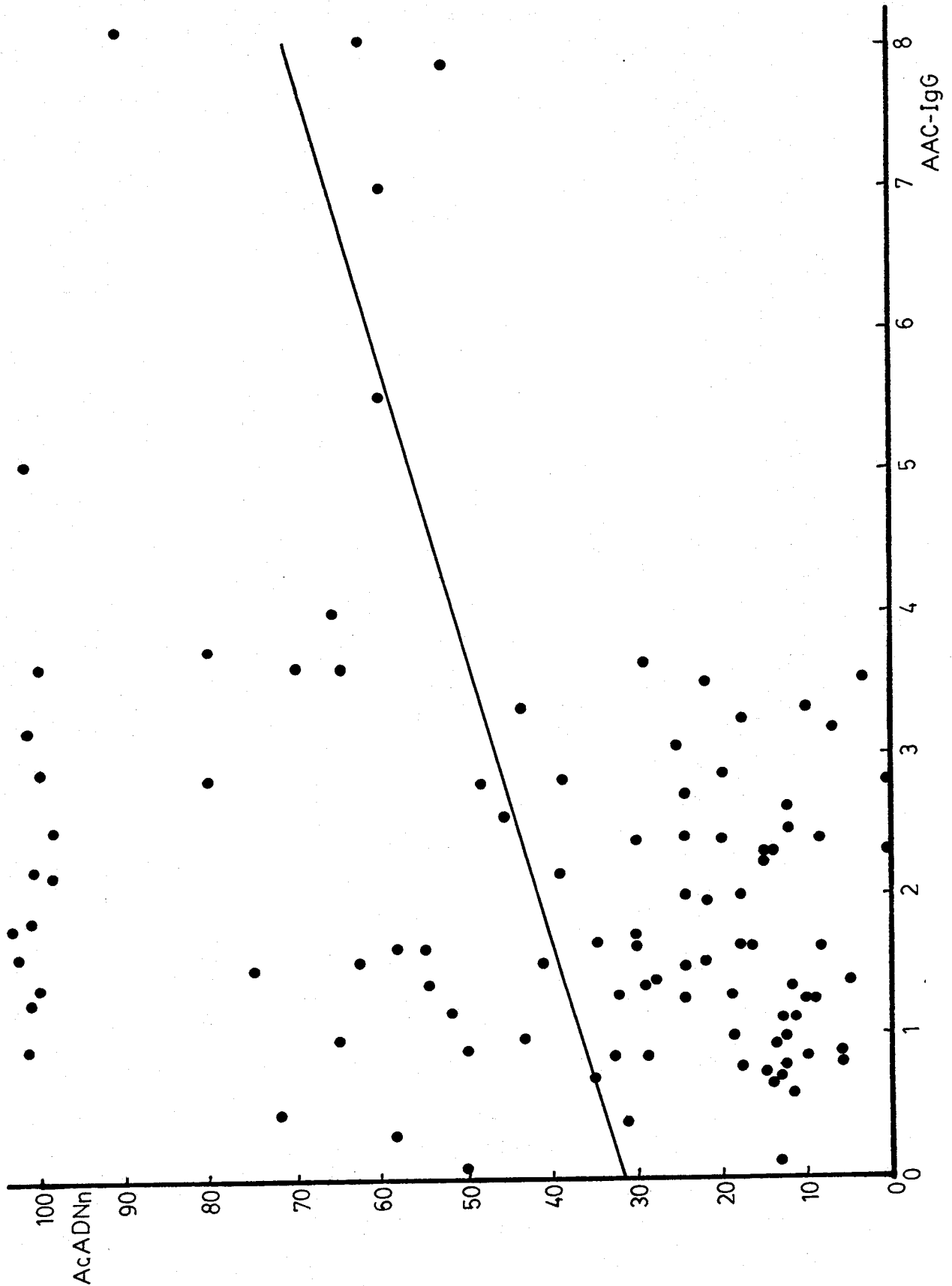


Figura 25.- Correlació entre el títol d'AAC-IgG i els anticossos anti-ADN nadiu.

6.2.3.3.2. ASSOCIACIÓ AMB ELS ANTICOSSOS ANTI-ENA

Es van detectar anticossos anti-ENA en 37 malalts (37 %), dels quals 12 (32 %) tenien AAC. No es va trobar associació estadísticament significativa entre aquests autoanticossos i els AAC.

Per tipus, la distribució dels anticossos anti-ENA va ser la següent:

- Anticossos anti-Ro: 17 malalts (7 amb AAC).
- Anticossos anti-La: 10 malalts (2 amb AAC).
- Anticossos anti-Sm: 10 malalts (4 amb AAC).
- Anticossos anti-RNP: 15 malalts (5 amb AAC).

Tampoc no es va trobar associació significativa entre cap d'aquests tipus d'anticossos anti-ENA i els AAC.

6.2.3.3.3. ASSOCIACIÓ AMB ELS FACTORS DEL COMPLEMENT

Es va objectivar disminució dels factors del complement en 47 malalts (47 %), 18 dels quals (37 %) presentaven un títol positiu d'AAC. No es va trobar associació estadísticament significativa entre aquesta hipocomplementèmia i els AAC.

En analitzar els factors del complement per separat, es van trobar 24 malalts amb disminució de C_3 (37 % dels quals tenien AAC), 35 amb disminució de C_4 (46 % amb AAC) i 41 amb disminució de CH50 (39 % amb AAC). Tampoc no es va trobar associació significativa entre el descens de cap d'aquests factors del complement i els AAC.

VII. DISCUSSIÓ

En el decurs dels últims anys, el LES ha estat objecte de nombrosos estudis clínics i immunològics que han permès, juntament amb les dades obtingudes del model experimental animal, aprofundir en la seva etiopatogènia i millorar el maneig clínic dels malalts amb aquesta afecció (1-8).

Les característiques clíniques d'aquesta entitat han estat ben definides en estudis amb àmplies sèries de malalts. En aquest aspecte, la sèrie estudiada en aquesta Tesi Doctoral és semblant a la majoria de les publicades a nivell nacional i internacional. Totes elles coincideixen en destacar el seu predomini en el sexe femení, el qual varia entre un 78 i un 96 % (26,35,39-43). En el present estudi, el 93 % dels malalts eren dones, xifra, per tant, semblant a la trobada en la majoria de les sèries.

La simptomatologia inicial atribuïble al LES es va presentar fonamentalment entre la segona i tercera dècades de la vida. Només en el 10 % dels casos analitzats es va iniciar després dels 50 anys. Aquest predomini del sexe femení i la incidència elevada de la malaltia en el període fèrtil de la dona donen suport a la participació d'un factor hormonal en el LES, com coincideixen en afirmar la majoria dels investigadors (45,88,90,92,96,97).

Les manifestacions clíniques al llarg de l'evolució de la malaltia es detallen a la figura 5 i tampoc no difereixen de

forma apreciable de les referides a altres sèries (37,44,450-453). Així, l'artritis va ser el símptoma més freqüent (65 %), seguit per les manifestacions cutànies (55 %), principalment l'eritema en vespertili.

L'afecció renal va ser present en el 33 % dels casos i és important destacar l'àmplia variació de les formes anatomopatològiques, sent més freqüents les glomerulonefritis proliferatives (segmentàries i difuses). Fins a dates molt recents, l'existència d'afecció renal en el LES es considerava com a un factor de mal pronòstic. No obstant això, els últims anys ha estat comprovat que no sempre és així i que l'evolució dels malalts amb afecció renal no és necessàriament pitjor que la d'aquells sense la mateixa, en especial quan no existeixen formes proliferatives (26,40-42,44,451-453).

Altres manifestacions clíniques presents en els malalts d'aquest estudi van ser serositis (31 %), vasculitis i fenomen de Raynaud (23 %) i afecció del sistema nerviós central (migrama i epilepsia)(16 %). Les alteracions hematològiques trobades van ser leucopènia (31%), trombocitopènia (26%) i anèmia hemolítica (9%).

El LES és una entitat que té com a tret més característic la formació de nombrosos autoanticossos dirigits contra les pròpies cèl.lules de l'organisme. Aquests autoanticossos tenen el seu origen en la disregulació del sistema immunitari, sobre el qual actuen factors genètics, hormonals i ambientals, que alteren les seves dues vessants, la humoral i la cel.lular (2,46). Alguns d'aquests autoanticossos produeixen directament una acció citotòxica o citolítica sobre diferents cèl.lules de l'organisme (reacció immunitària de tipus II), mentre que d'altres formen en el torrent circulatori complexos antígen-anticòs que, en ser dipositats als diferents òrgans i teixits, produiran les lesions inflamatòries responsables de la majoria de les manifestacions clíniques de la malaltia (reacció immunitària de tipus III) (37,38).

D'entre els diversos autoanticossos descrits al LES, els AAF destaquen per l'interès creixent que durant els últims anys està prenent el seu estudi. Es caracteritzen per ser un grup heterogeni d'autoanticossos adquirits de forma espontània, de tipus IgG, IgM o IgA, que van dirigits contra estructures fosfolipídiques de càrrega negativa de les membranes cel.lulars (9-14).

La seva detecció ha vingut realitzant-se des de la dècada dels cinquanta de forma indirecta mitjançant diverses tècniques. Les més clàssiques són les proves coagulomètriques, que detecten anticossos dirigits contra la fracció fosfolipídica del complex protrombinasa i que reben el nom genèric d'AL (201,214,242-245).

Un altre mètode clàssic, però també indirecte, per a la determinació d'AAF consisteix en la detecció d'una SLFP mitjançant tècniques reagíniques (VDRL, RPR) que posen de manifest la presència d'anticossos dirigits contra una mescla de cardiolípic, lecitina i colesterol (204,283-295).

Els últims anys, però, han estat introduïdes diverses tècniques immunològiques, com són el RIA i l'ELISA, per a la determinació de forma directa dels AAF. Aquestes tècniques han permès el reconeixement de diversos tipus d'aquests anticossos (AAC, antifosfatidilserina, antifosfatidilinositol, anti-àcid fosfatídic, etc)(246-255).

De tots ells, els AAC han estat els que han merescut un major interès per part dels investigadors. Així, actualment es considera que la detecció d'aquests autoanticossos per la tècnica d'ELISA aporta molts avantatges en el camp d'investigació dels AAF, entre els quals hi destaquen (23,24): 1) medicació directa de l'anticòs capaç de reaccionar amb un antigen específic, sense la possibilitat d'interferències per altres substàncies, 2) quantificació dels seus nivells, 3) possibilitat de detectar els diferents isotipus (IgG, IgM o IgA), 4) semblant sensibilitat que el RIA, sense l'inconvenient d'utilitzar material radioactiu, 5) cost econòmic menor, 6) major rapidesa de realització, amb l'avantatge addicional d'analitzar un gran nombre de casos simultàniament i 7) utilització de sèrum i, per tant, possibilitat d'estudiar malalts anticoagulats.

No obstant això, encara no existeix unanimitat en l'estandardització de la tècnica, per la qual cosa cada laboratori ha de desenvolupar una sistemàtica de realització pròpia, assignar als resultats unes unitats que cal comparar posteriorment amb uns estàndards internacionals i, finalment, determinar uns valors de normalitat.

La sistemàtica de realització desenvolupada per a portar a terme el present estudi, basada en la descripció original de Loizou et al.(23), consisteix bàsicament en aplicar una tècnica d'ELISA en fase sòlida utilitzant cardiolípicina com a antigen i dos pisos d'anticossos, l'últim dels quals conjugat amb l'enzim fosfatasa alcalina, que permeten detectar AAC dels isotipus IgG i IgM. Entre les modificacions efectuades al nostre laboratori cal destacar la utilització d'1,5 ug de cardiolípicina a cada pouet de la placa d'ELISA, després de diluir-la en etanol a una concentració de 50 ug/ml. Amb aquesta quantitat d'antigen han estat obtinguts els millors resultats pel que respecta a la capacitat de la tècnica per a distingir entre la presència de diverses quantitats d'anticossos.

El problema de l'assignació d'unitats als resultats obtinguts amb la tècnica d'ELISA tampoc no està encara definitivament resolt. La majoria d'autors, però, solucionen la qüestió comptant el número de desviacions estàndard que s'aparta cada resultat de la mitjana (249,260,387,404).

Harris et al. (454), per la seva banda, han intentat assignar als resultats unes unitats anomenades GPL i MPL. Una unitat GPL és definida pels autors com l'activitat d'unió a la cardiolípina d'1 ug/ml d'una preparació d'AAC-IgG purificats procedents d'un sèrum estàndard. Per la seva banda, una unitat MPL és definida com l'activitat d'unió a la cardiolípina d'1 ug/ml d'una preparació d'AAC-IgM purificats procedents d'un sèrum estàndard. La conversió dels resultats en unitats GPL o MPL requereix l'aplicació d'una fórmula logarítmica que complica la seva utilització.

Amb la finalitat d'assignar als resultats obtinguts unes unitats de càlcul senzill, al present estudi aquests s'expressen com a índex d'unió (IU), mostrant la relació entre la densitat òptica (DO) del sèrum problema i la del grup control sa. La unitat (1 U.) equival així a una DO del sèrum problema igual a la DO del grup control sa.

Com a control de qualitat de la tècnica es va utilitzar un grup de sèrums de referència amb quantitats conegudes d'AAC. Aquests sèrums, preparats a l'"Arthritis Research Laboratory" de l'Hospital St. Thomas de Londres i cedits pel Dr. E.N. Harris, han estat acceptats com a referències estàndards internacionals (fig. 6). Els assaigs realitzats al nostre laboratori van ser considerats com a correctes d'acord amb els sèrums de referència, donades les seves regressions lineals, coeficients de determinació i variacions inter-assaigs (454).

Finalment, el tercer problema quant a l'estandardització de la tècnica rau en la determinació dels valors de normalitat. L'estudi fet en aquest treball demostra que la població sana presenta una distribució no normal dels títols d'AAC, amb diferències segons l'isotipus (fig. 7). Aquesta distribució passava a ser de característiques normals en convertir els IU en els seus logaritmes (distribució log-normal).

Aquesta especial distribució mostra com existeixen individus sans amb títols relativament alts d'AAC i obliga a computar com a valors patològics només els títols més elevats dels AAC, per tal d'evitar el màxim nombre de falsos positius. En aquest sentit, han estat considerats com a positius en el present estudi només els títols el logaritme de l'IU dels quals assolía una probabilitat superior al 98 % de no pertànyer a un grup normal. Segons aquesta premisa, els títols positius eren aquells superiors a 2,8 U. en el cas dels AAC-IgG i a 4,07 U. en el cas dels AAC-IgM (tabla 7). Això equival a 3,76 DE i 3,89 DE, respectivament (tabla 8). Aquests resultats són de particular interès, donat que diversos estudis publicats prèviament consideren positius títols equivalents només a 2 o 3 DE (249,260,387,404). És probable, doncs, que en aquests estudis s'inclogui un nombre prou elevat de falsos positius.

La incidència dels AAC en els malalts diagnosticats de LES varia entre el 6 % i el 70 %, segons les sèries publicades (241,249,251,259,260,387,401,403,404). Aquestes grans diferències poden ser degudes a fluctuacions en relació amb l'activitat clínica, la terapèutica administrada o bé la procedència dels malalts (401). No obstant això, el més probable és que tradueixi l'àmplia variabilitat de les tècniques utilitzades i la manca d'estandardització en la seva realització i en la determinació dels valors de normalitat (454-456). La incidència trobada en el present estudi (36 %) és similar a l'objectivada pels altres autors que utilitzen la tècnica d'ELISA amb una metodologia semblant a la utilitzada aquí.

Si bé és en el LES on han estat millor estudiats, els AAC també poden aparèixer en un títol elevat en altres patologies de tipus autoimmune, en ocasions com a forma de manifestació inicial, en infeccions i neoplàsies (257-261,458)(tabla 2).

Això ha estat també objectivat en el present estudi, on s'ha detectat una incidència del 8 % a l'esclerosi sistèmica progressiva, del 3 % a la dermatomiositis-polimiositis, del 33 % a l'artritis reumatoïde, del 8 % a l'arteritis de Horton, del 44 % a la cirrosi biliar primària i del 9 % a la púrpura trombocitopènica idiopàtica. Resulta interessant destacar que en aquestes malalties, excepte en l'artritis reumatoïde i la cirrosi biliar primària, la incidència ha estat inferior a l'objectivada en el LES, atorgant un cop més a aquesta entitat la màxima

representativitat dintre de les malalties sistèmiques immunològiques. L'alta incidència d'AAC a l'artritis reumatoïde i a la cirrosi biliar primària podria ser deguda a una possible reacció creuada dels AAC amb el factor reumatoïde i els anticossos antimitocondrials, com ha estat observat per alguns autors (457).

Un fet que recentment ha cridat l'atenció de molts investigadors és la detecció d'AAC i altres AAF en malalts que presenten fenòmens trombòtics, ocasionalment associats a altres manifestacions clíniques o biològiques d'autoimmunitat, sense reunir criteris diagnòstics suficients de cap malaltia sistèmica immunològica coneguda. Aquest és el cas, per exemple, de malalts joves amb trombosis venoses, infarts de miocardi o accidents vasculars cerebrals, sense factors de risc, i de dones amb avortaments i morts fetals de repetició per trombosis placentàries i/o fetals d'etiologia no aclarida, en els quals s'objectiva la presència d'AAC com a alteració immunològica destacable.

Aquest fet, comentat per primera vegada per Soulier i Boffa l'any 1980 (357) i que actualment està sent també objecte d'estudi fora d'aquesta Tesi pel nostre grup d'investigació (459), ha motivat la definició per diversos autors de l'anomenada síndrome similar al lupus ("lupus-like") (388) o, com també se la denomina actualment, síndrome antifosfolipid primària (459). En aquesta síndrome estarien inclosos aquells malalts amb manifestacions

clíniques associades als AAF però sense criteris diagnòstics de cap altra entitat.

Durant alguns anys es va considerar que els AAF (l'AL i la SLFP) eren només un marcador més del LES. Fins i tot, a la SLFP se li va atorgar per part de l'ARA el valor de criteri diagnòstic (149). Això era degut a que els primers estudis sobre l'AL es van fer en malalts que presentaven fenòmens hemorràgics (201) però ben aviat es va comprovar que aquests eren molt poc freqüents en el LES i que l'AL no s'associava habitualment als mateixos.

No obstant, recentment, diversos investigadors han trobat una associació entre la seva presència i l'existència de fenòmens trombòtics, avortaments de repetició i trombocitopènia, entre d'altres manifestacions clinico-biològiques (9-14). Tot això ha revifat l'interès per l'estudi d'aquests autoanticossos i les seves associacions amb manifestacions clinico-biològiques del LES, amb altres marcadors immunològics i, tanmateix, les relacions mútues entre ells (AL, SLFP, AAC).

La presència dels AAC ha estat descrita associada fonamentalment a l'existència de fenòmens trombòtics, tant arterials com venosos, que poden afectar a qualsevol territori, com els vasos de les extremitats, coronaris, cerebrals,

intraabdominals o placentaris, responsables aquests últims dels avortaments i de les morts fetals de repetició que presenten moltes malaltes amb LES (9-14). Alguns autors, però, dubten d'aquesta associació (460).

Al nostre estudi, sí que ha estat trobada una associació estadísticament significativa entre la presència d'AAC i l'existència de fenòmens trombòtics (fig. 8). Aquesta associació ha estat lligada concretament a la presència d'AAC-IgG (fig. 9). Tanmateix, cal fer també esment del lligam al títol d'AAC-IgG que ha estat trobat en aquest estudi. Així, tot plegat, els malalts amb una major incidència de trombosis han estat aquells amb un títol més alt d'AAC-IgG (fig. 10).

Les discrepàncies trobades per alguns autors respecte a l'associació dels AAC amb fenòmens trombòtics poden ser degudes, per una part, a la tècnica utilitzada per a la detecció dels AAC, però també, als criteris d'inclusió en els estudis dels fenòmens trombòtics. Així, cal destacar que en el present treball només han estat inclosos els fenòmens trombòtics presents en el moment de la determinació dels AAC. Han estat exclòses, per tant, les trombosis antigues. Això ha estat realitzat d'aquesta manera tenint en compte que, des que els malalts havien presentat aquestes manifestacions clíniques trombòtiques fins el moment de la determinació dels AAC, poden haver variat substancialment els títols d'AAC, de forma espontània o com a conseqüència de la terapèutica administrada.

Es de destacar l'absència d'associació estadísticament significativa trobada en aquest estudi entre la presència d'AAC i l'existència d'avortaments o morts fetals de repetició (fig. 11). La majoria d'autors, però, consideren que existeix una relació entre aquests anticossos i els avortaments i les morts fetals de repetició en les malalties amb LES (384,387). Les discrepàncies trobades en aquest treball poden ser precisament degudes al fet que cap de les malalties estudiades va presentar l'avortament o la mort fetal durant el temps de la seva realització i, per tant, la determinació del títol d'AAC no coincideix temporalment amb l'avortament o la mort fetal. Aquests resultats remarquen la importància d'analitzar les associacions entre els AAC i les manifestacions clíniques presents i no antigues, donat que els títols d'AAC poden variar al llarg del temps.

La presència d'AAC ha estat també descrita per molts autors associada a l'existència de trombocitopènia (249,363,387). Al present estudi ha estat trobada també aquesta associació de forma estadísticament significativa. Concretament, l'associació ha estat lligada a la presència també d'AAC-IgG i al seu títol (fig. 12,13 i 14).

Alguns autors han trobat una associació entre els AAC i manifestacions clíniques d'afecció del sistema nerviós central (11). Les manifestacions més freqüentment comunicades han estat la mielopatia transversa similar a l'esclerosi múltiple ("esclerosi lupoidal"), migranya i corea (390). També han estat descrits casos

aïllats d'associació amb epilepsia, síndrome de Guillain-Barré i neuritis òptica (367).

Durant el temps que va durar la recollida de dades per al present estudi, només es van objectivar manifestacions clíniques lleus d'afecció del sistema nerviós central, com són la migranya i l'epilepsia (tabla 22). No es va trobar associació de forma significativa entre la presència d'aquestes manifestacions clíniques i l'existència d'un títol elevat d'AAC (fig. 15). Són necessaris, però, estudis amb més casos de manifestacions neurològiques per a confirmar l'existència o no d'associació entre els AAC i aquestes manifestacions clíniques.

Si bé en un número reduït de casos, ha estat descrita la presència d'AAC en malalts amb diverses altres manifestacions clinico-biològiques (11). En el present treball han estat analitzades les possibles associacions d'aquests autoanticossos amb l'existència de nefropatia lúpica, artritis, afecció cutània, serositis, vasculitis i fenomen de Raynaud. No es va trobar associació significativa entre l'aparició de cap d'aquestes manifestacions i l'existència de títols positius d'AAC (tabla 23).

Un fet trobat per alguns autors és l'associació dels AAC amb anèmia hemolítica autoimmune amb prova de Coombs positiva (354). Al present treball també ha estat trobada aquesta associació i de forma estadísticament significativa. Tanmateix, resulta molt

interessant el fet que l'associació va lligada a la presència i al títol d'AAC-IgM (fig. 16 i 17).

Un resultat a destacar del present treball és la troballa d'associació significativa entre la presència d'AAC de l'isotipus IgM i l'existència de neutropènia. De forma semblant a les associacions anteriorment descrites, també existia una correlació amb el títol d'anticossos detectat (fig. 18 i 19). No es va trobar, en canvi, associació amb l'existència de limfopènia, la qual és una altra manifestació biològica molt freqüent en els malalts amb LES i que és considerada per l'ARA com a un dels criteris diagnòstics (149). No obstant, actualment és acceptat que el mecanisme fonamental pel qual es produeix la limfopènia és degut a l'acció dels anticossos limfocitotòxics.

Un fet àmpliament debatut és l'associació dels AAC amb l'activitat clínica del LES (13,15-18,461). Isenberg et al. (16) van observar que existia una correlació entre els nivells d'AAC i l'activitat clínica i biològica d'aquesta malaltia. En el present estudi, ha estat trobada una associació estadísticament significativa entre la presència d'un títol positiu d'AAC i l'existència d'activitat clínica del LES (fig. 20 i 21). Concretament, els AAC-IgG obtenen una sensibilitat en la detecció d'activitat del 40 %, una especificitat del 87 %, un valor de predicció positiva del 67 % i de predicció negativa del 68 % i una eficàcia del 68 %.

Aquests resultats atorgarien als AAC-IgG la característica de ser uns relativament bons marcadors d'activitat del LES, en comparació amb els altres marcadors clàssics d'activitat. Així, en un estudi fet per Font et al. (462) amb un grup de 150 malalts lúpics, molts dels quals han estat inclosos en la present sèrie, es va comprovar que els Ac Anti-ADNn tenien una sensibilitat en la detecció d'activitat del 50 %, una especificitat del 70 % i una eficàcia del 60 %. Per la seva banda, el descens del CH50 tenia una sensibilitat del 38 %, una especificitat del 84 % i una eficàcia del 66 %. Finalment, els CIC tenien una sensibilitat del 39 %, una especificitat del 78 % una eficàcia del 64 % (tabla 28).

Malgrat aquesta associació dels AAC amb la existència d'activitat clínica del LES, es comprova al present estudi que això és degut a que són marcadors de trombocitopènia i d'anèmia hemolítica. En canvi, els AAC no són capaços de detectar l'existència d'activitat clínica diferent a aquestes dues manifestacions clíniques. Per aquest motiu, es pot concloure que els AAC no s'haurien de fer servir com a marcadors generals d'activitat clínica del LES.

Un altre aspecte que mereix la màxima atenció per part dels investigadors és la relació entre els AAC, l'AL i la SLFP. La

majoria dels autors comproven l'existència d'una mútua relació entre aquests AAF, si bé poden trobar-se de forma independent i alguns malalts presenten positivitat de només un o dos d'ells (463-465). Aquests resultats són semblants als trobats al present estudi.

Degut a això, actualment es considera que els AAC, l'AL i la SLFP són anticossos amb especificitats antigèniques diferents dintre de les estructures fosfolipídiques, tant en la seva composició com en la càrrega elèctrica (463-465). Aquestes diferències semblen reflectir-se també a nivell de la seva evolució i resposta a la terapèutica. Així, han estat comprovades per diversos autors oscil·lacions independents dels AAC i de l'AL al llarg del temps, de forma espontània o amb tractament, com per exemple, la normalització de l'AL mentre romanen positius els AAC.

Fent referència a l'associació dels AAC i l'AL cal també destacar la importància que pot tenir la forma de determinar la presència d'un AL. Així, han estat descrites múltiples tècniques de detecció de l'AL, la majoria de les quals són proves coagulomètriques dependents de fosfolípids (276-281). Aquestes tècniques es basen en el fet que l'AL inhibeix "in vitro" l'activació de la protrombina per la seva acció sobre el component fosfolipídic del complex protrombinasa de la coagulació. Les més utilitzades són el TTP, TTPA, TP, TITD, TVERD, TR, TC i TCE.

Un fet a remarcar és que existeix una considerable variabilitat en els resultats obtinguts amb aquestes tècniques pel que fa a la seva sensibilitat en detectar AL (20-22,278). Aquesta variabilitat és deguda a molts factors, però els més importants són: 1) les preparacions comercials de fosfolípids varien considerablement en el seu contingut, quantitativament i qualitativament, 2) la persistència en el plasma de plaquetes (amb fosfolípids a les seves membranes) en número variable malgrat que es centrifuga prèviament, 3) la inexistència d'una total estandardització en la realització de les tècniques i en la definició dels resultats, i 4) la possible influència en els resultats de l'activitat de la malaltia i de la terapèutica administrada al malalt (201,279-281). Per a augmentar l'especificitat en la detecció d'AL han d'utilitzar-se també altres tècniques, com són la incubació amb plasma normal (242,243) i la neutralització amb plaquetes (20).

En el present estudi, el TTPA mostra una sensibilitat en la detecció d'AL molt baixa, mentre que són el TITTD i el TVERD les tècniques amb una major sensibilitat (fig. 22). La manca de sensibilitat del TTPA sembla estar en relació amb diferències en el contingut total de fosfolípids, especialment de fosfatidilserina, que sembla tenir un paper important en l'especificitat de l'AL (280,466). Alguns autors tendeixen a obviar aquest problema amb la utilització del TTPA diluït (467).

Aquests resultats indiquen que, en nombroses ocasions, són necessàries varies proves per a identificar la presència d'un AL. A l'igual que altres autors, segons els resultats del present treball el TVERD constitueix una de les més útils (20,468,469). A més a més, no s'altera per l'existència d'anticossos enfront dels factors VIII, IX o XI (468) i la seva realització és senzilla i altament reproductible.

Un inconvenient, però, comú a totes aquestes proves de detecció de l'AL és la seva alteració davant l'existència d'una terapèutica anticoagulant. Aquest fet podria solventar-se en un futur amb la utilització de tècniques d'ELISA per a la detecció de l'AL (470). Aquestes tècniques, que es troben actualment en fase d'experimentació, podrien permetre la utilització de sèrum per comptes del plasma que es requereix per a la realització de les proves coagulomètriques.

Un aspecte també estudiat al present treball és la relació entre els AAC i altres marcadors immunològics, com són els anticossos anti-ADN nadiu, els anti-ENA i els factors del complement. Alguns autors, com Isenberg et al. (16), han observat una correlació significativa entre els títols d'AAC i d'anticossos anti-ADN nadiu. Això els hi suggereix l'existència d'una reactivitat creuada dels AAC amb certs determinants antigènics de

naturalesa fosfolipídica de l'ADN. Segons aquests supòsits, un subgrup d'anticossos anti-ADN s'uniria als grups fosfodièster de la cadena de l'ADN i, per tant, serien també un altre grup d'AAF (13,471-473). Al present estudi s'ha confirmat aquesta correlació estadística entre els AAC i els anticossos anti-ADN nadiu, si bé alguns malalts amb títols elevats d'AAC tenien un títol baix d'anticossos anti-ADN nadiu i viceversa.

Són interessants en aquest sentit les troballes de Rauch et al. (474,475) amb hibridomes d'AAF. Aquests autors observen que alguns d'aquests anticossos tenen activitat només com a AL, mentre que d'altres actuen també com a anticossos anti-ADN, factor reumatoïde, anticossos anticitoesquelet i/o anticossos antiplaquetaris. El grau d'interrelació entre aquests subgrups i els epitops responsables d'aquestes múltiples reactivitats resta per ser determinat.

Pel que respecta a la possible associació entre els AAC i els anticossos anti-ENA o els factors del complement, aquesta no ha estat objectivada al present estudi, si bé alguns autors han observat una correlació entre els AAC i el descens de C₃ (476).

Una altra qüestió encara per resoldre és la relació que existeix entre els AAC i les manifestacions clínico-biològiques

associades estadísticament amb la seva presència. No es troba suficientment aclarit si els AAC, o els altres AAF, són els responsables, directament o indirecta, d'aquestes manifestacions o són solament un epifenomen o marcadors biològics sense participació etiopatogènica en elles.

A favor de la primera possibilitat estan les observacions experimentals de Carreras et al. (334), els quals van objectivar que aquests anticossos produeixen una inhibició de la síntesi i l'alliberament de prostaciclina per les cèl.lules endotelials, la qual conduiria a l'aparició de fenòmens trombòtics. Recentment, però, diversos autors (477,478) coincideixen en afirmar que els AAC no només no inhibeixen l'alliberament de la prostaciclina sinó que estimulen la seva síntesi en cultius de cèl.lules endotelials.

Més suggestives són les observacions de Comp et al. (322) els quals consideren que els AAC provocarien la inhibició de la trombomodulina. Aquesta és una glicoproteïna de l'endoteli vascular que conté un component fosfolipídic. La unió de la trombomodulina amb trombina activa la proteïna C, la qual té un marcat efecte antitrombòtic o fibrinolític. Aquesta acció antitrombòtica la realitza mitjançant tres mecanismes: la inhibició de l'alliberament de l'inhibidor de l'activador tissular del plasminogen, la inactivació del factor V i, finalment, la inactivació del factor VIII. La inhibició de la trombomodulina per l'acció dels AAC conduiria a la inhibició de la fibrinòlisi i a la potencial formació de trombosis (317-326).

Una altra hipòtesi atractiva que implicaria de forma indirecta els AAC en la etiopatogènia de les trombosis podria ser que els malalts amb AAC desenvolupessin anticossos antiidiotípic (anti-AAC). Aquests anticossos podrien imitar la imatge interna de l'autoantigen i tenir una estructura similar a la dels fosfolípids procoagulants (316).

Els AAC també podrien unir-se a les cèl.lules hemàtiques i neuronals i produir les manifestacions hematològiques i neurològiques que han estat descrites associades a la seva presència. Així, la unió a les plaquetes produiria la trombocitopènia, la unió a les hematïes l'anèmia hemolítica, la unió als neutròfils la neutropènia i la unió a les neurones la mielopatia transversa.

Tot i l'existència d'aquestes suggestives hipòtesis, un problema inquietant a l'hora d'assignar un paper etiopatogènic als AAC és el fet que molts malalts amb un títol elevat d'AAC romanen asimptomàtics mentre que altres presenten un tipus de manifestacions i uns altres unes manifestacions diferents. Sembla, per tant, altament probable que han d'existir altres factors, encara desconeguts a hores d'ara, que participin, potser associats amb els AAC o amb altres AAF, en la etiopatogènia d'aquestes manifestacions clínico-biològiques.

Fent referència a aquest problemàtic aspecte, resulten interessants alguns dels resultats del present estudi. Així, la

presència de fenòmens trombòtics i trombocitopènia ha estat trobada associada a l'existència d'AAC de l'isotipus IgG. Per la seva banda, la presència d'anèmia hemolítica i neutropènia s'ha trobat lligada als AAC de l'isotipus IgM. També, en tots aquests casos, la presència de manifestacions clíniques ha guardat una correlació amb el títol d'aquests anticossos. Així, els títols més elevats d'AAC eren els que tenien un valor de predicció positiva més alt d'aparició de manifestacions clíniques. Podria, per tant, postular-se que l'aparició de les diverses manifestacions clíniques dependria de l'isotipus d'AAC present i del títol d'aquests. Aquests resultats coincideixen amb els recentment comunicats per Alarcón-Segovia (476) i, d'acord amb aquest autor, es podria considerar que la presència de trombosis i de trombocitopènia dependria d'un títol alt d'AAC-IgG i la d'anèmia hemolítica i neutropènia d'un títol elevat d'AAC-IgM.

Tanmateix, no s'ha d'oblidar que en la patogènia d'aquestes manifestacions clíniques també ha estat descrita la participació en ocasions d'altres agents. Així, en la producció de trombosis en el LES poden coexistir altres factors com són vasculitis (479), CID (225), endocarditis de Libman-Sacks (480), CIC, síndrome nefròtica (481) i dèficit d'antitrombina III (482), a més a més dels factors coneguts de risc aterogen (hiperlipèmia, hiperglicèmia, tabaquisme, hipertensió arterial...) (483,484) i d'estasi venós. En la patogènia dels avortaments i les morts fetals també poden participar factors com els anticossos anti-Ro (361) o els limfocitotòxics i les causes ovulars o materns

habituals (anomalies cromosòmiques, infeccions...)(486). Finalment, en l'etiopatogènia de la trombocitopènia en el LES ha estat descrita també l'acció d'anticossos antiplaquetaris (217) i antihistones (476). Per tant, els AAF podrien estar directament relacionats amb aquestes manifestacions clíniques en determinats casos, mentre que altres vegades serien un factor de risc més.

Un altre aspecte a destacar és el que fa referència a la terapèutica que cal administrar als malalts amb AAC. Diversos autors (242,259,266,331,333,381,382) han observat una disminució dels AAC amb corticoides i amb altres immunosupressors. No obstant això, actualment es considera que no està justificat el tractament dels malalts amb AAC però sense manifestacions clíniques.

En canvi, han estat obtinguts molt bons resultats en el tractament de les dones embaragades amb antecedents d'avortaments i morts fetals de repetició, mitjançant l'administració de dosis baixes de prednisona (20-30 mg/dia) i àcid acetilsalicílic (50-100 mg/dia), les quals condueixen a embaragos a terme en el 90 % dels casos (335,359,378,383).

En els malalts amb fenòmens trombòtics actius, o amb l'antecedent d'haver-hi patit, sembla indicat un esforç per a

eliminar o, al menys, reduir els AAC. El problema rau en determinar quin és el tractament més adient en aquests casos (9). El paper dels antiagregants plaquetaris i dels anticoagulants en la prevenció i el tractament de les trombosis en malalts amb AAC és incert (258,259,333,384-426). L'experiència de diversos grups d'investigació sembla indicar que alguns malalts continuen presentant trombosis malgrat una adequada teràpia anticoagulant. L'addició de corticoides, probablement a dosis moderades, sembla indicada en aquests casos. Actualment es troba en curs un estudi prospectiu multicèntric internacional (programa KAPS)(427), en el qual participa el nostre grup d'investigació, destinat a avaluar diferents pautes terapèutiques en un número suficientment elevat de malalts.

Com a conseqüència dels estudis realitzats els últims anys i de l'important paper que ha estat atorgat en ells als AAC i als altres AAF, com ha quedat manifest també en la present Tesi Doctoral, diversos autors han considerat necessària la descripció d'una nova síndrome. Encara que el terme ha estat subjecte d'algunes lleugeres modificacions en les reunions científiques que sobre el tema han estat realitzades, actualment se l'anomena síndrome antifosfolípid (459).

Així, han estat proposats diversos criteris diagnòstics per a la seva definició. Harris et al. agrupen una sèrie de manifestacions clíniques que amb major freqüència s'associen a la presència d'AAF (trombosis arterials i/o venoses, avortaments de repetició i trombocitopènia) juntament amb paràmetres de laboratori (AAC i AL). Per al diagnòstic d'aquesta síndrome es requeriria com a mínim un criteri clínic i un altre d'analític, amb la condició que els AAF siguin positius en més d'una ocasió, separades per un interval superior a vuit setmanes (487).

Recentment, Alarcón-Segovia ha proposat uns altres criteris, dividits en majors (pèrdua fetal recurrent, anèmia hemolítica, trombocitopènia, livedo reticularis i trombosis venoses i/o arterials) i menors (migranya i corea). Per al diagnòstic de la síndrome antifosfolípid caldria assolir dos criteris majors, o bé un de major i un altre de menor, tenir un títol positiu d'AAC i presentar un any o més d'evolució (476).

Aquesta síndrome antifosfolípid habitualment s'associaria al LES, com ha estat estudiat a la present Tesi Doctoral, però també podria associar-se a altres malalties. En aquests casos, es tractaria d'una síndrome antifosfolípid secundària. Quan el malalt no reünís criteris diagnòstics de cap altra malaltia es tractaria d'una síndrome antifosfolípid primària (459).

Ambdues propostes de criteris diagnòstics constitueixen un notable esforç per a unificar les definicions de la síndrome

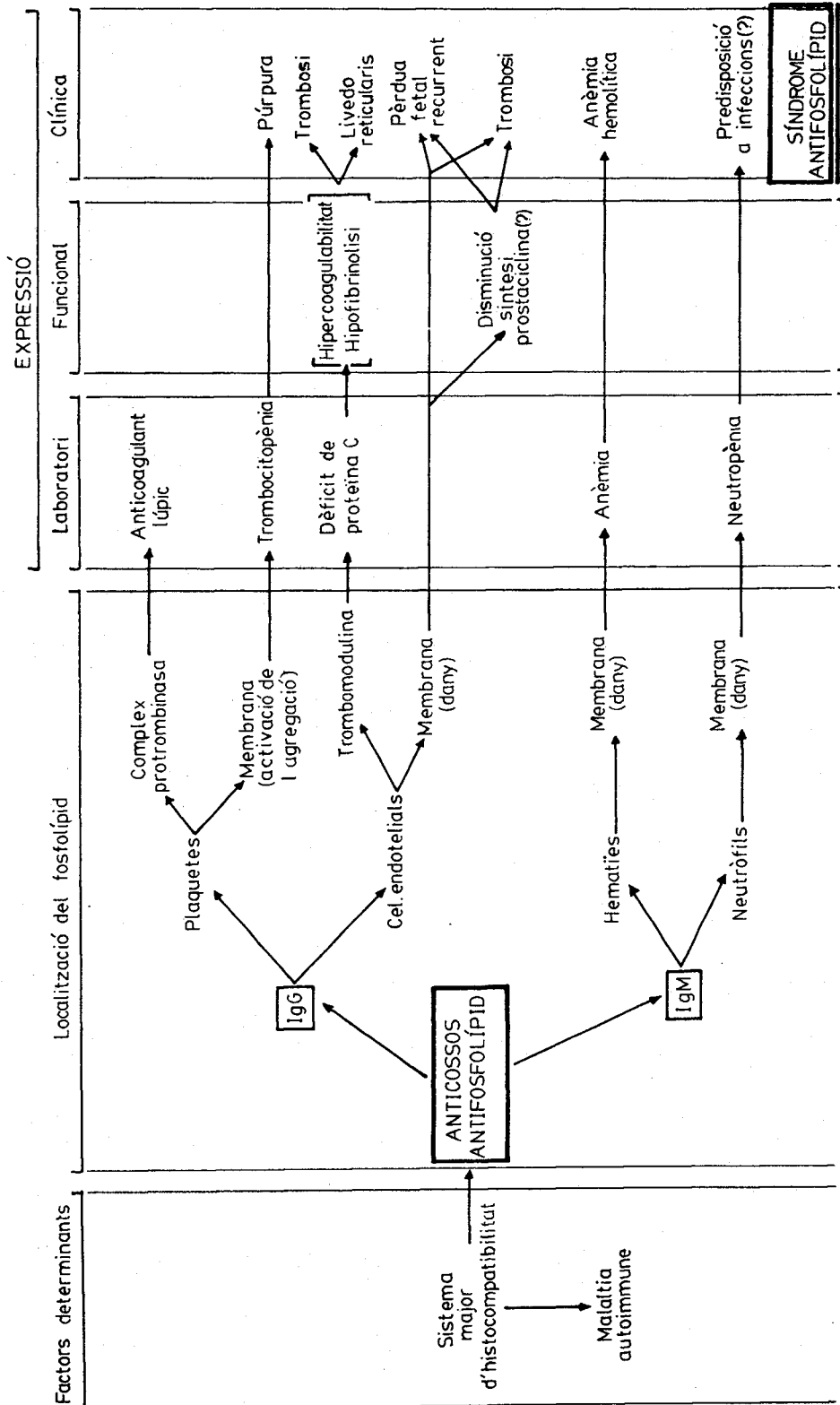


Figura 26.- Etiopatogènia de la síndrome antifosfolípid (modificada d'Alarcón-Segovia D.(476)).

antifosfolípid. No obstant, han de ser clarificades encara més quines són les manifestacions clíniques que realment s'associen a la presència d'AAF i quines són les tècniques més adequades per a determinar aquests anticossos.

A aquest respecte, tenint en compte els resultats del present i d'altres estudis, seria convenient incloure en aquesta síndrome, de moment, només les següents manifestacions clínico-biològiques: trombosis arterials i venoses (incloses els avortaments i les morts fetals per trombosis dels vasos placentaris i/o fetals i la livedo reticularis per trombosis o endarteropatia obliterant dels vasos digitals), trombocitopènia, anèmia hemolítica i, probablement, neutropènia. Les manifestacions neurològiques, i les altres manifestacions ocasionalment descrites en malalts amb AAF, és molt probable que requereixin encara més estudis per a ser considerades com a associades, si més no de forma estadísticament significativa, a la presència d'aquests anticossos.

Tanmateix, mentre no es disposi d'una prova de laboratori més específica per a la detecció de l'anticòs o del factor responsable d'aquestes manifestacions, caldria practicar simultàniament la determinació dels AAC i de l'AL, degut a que no sempre coincideixen al mateix temps en un mateix individu, donat que es tracta d'un grup heterogeni d'autoanticossos dirigits contra epitops diferents.

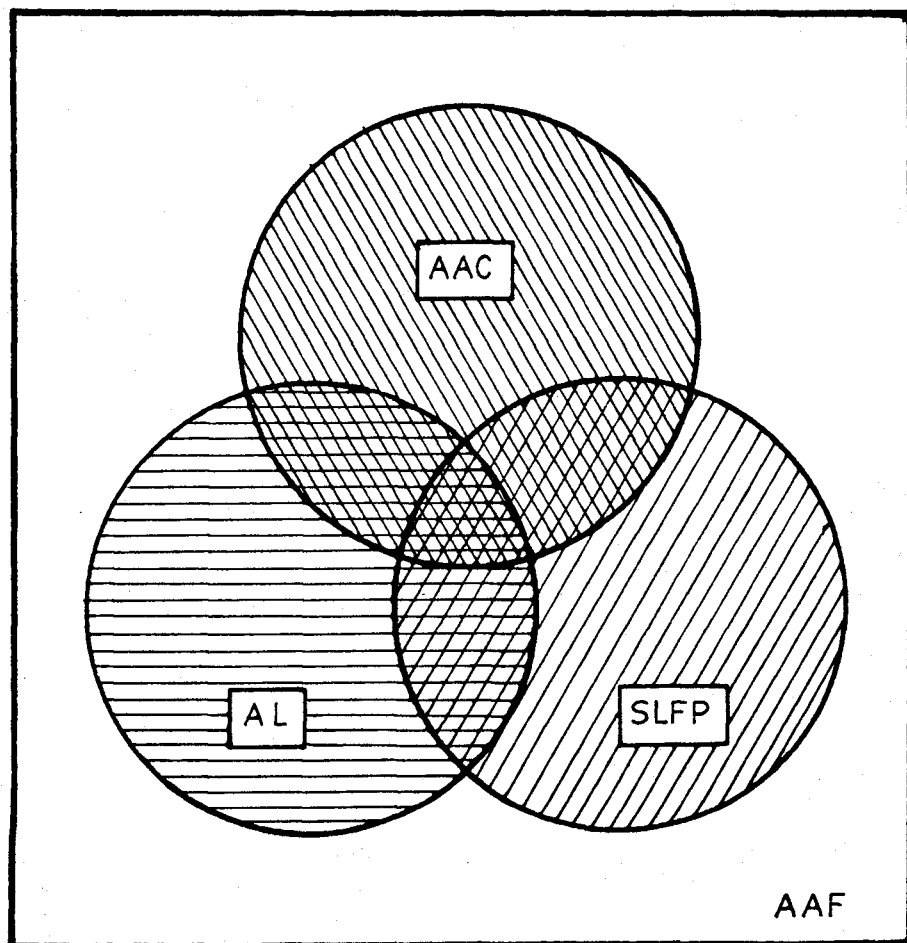


Figura 27.- Representació gràfica de la relació entre els AAC, l'AL i la SLFP.

L'estudi dels AAC i dels altres AAF ha merescut i mereixerà en el futur molts treballs, car són nombrosos els interrogants que resten oberts (488-506). Al llarg d'aquesta Tesi Doctoral ha estat possible analitzar alguns dels problemes que el seu estudi comporta. No obstant, cal encara aprofundir en els diversos aspectes que aquí han estat comentats. Tot això redundarà en l'elaboració d'uns protocols terapèutics adequats, amb la finalitat última d'evitar les complicacions, en ocasions fatals, que els malalts amb AAF poden presentar.

VIII. RESUM I CONCLUSIONS

El lupus eritematós sistèmic (LES) és una entitat sistèmica, de límits mal definits i d'etiologia poc coneguda, que es caracteritza per la formació d'anticossos dirigits contra nombrosos antigens cel·lulars, com a conseqüència de la disregulació del sistema immunitari, degut a la influència de diversos factors.

Els trastorns immunològics que intervenen en l'etiopatogènia del LES són tan variats i complexos que fins el moment present no ha estat possible determinar amb precisió quin és el fenomen inicial que desencadena el procés, el qual culmina amb una activació policlonal dels limfòcits B i la formació de nombrosos autoanticossos, responsables de la majoria de les manifestacions clíniques de la malaltia.

D'entre els diversos autoanticossos descrits al LES, els anticossos antifosfolípids (AAF) destaquen per l'interès creixent que durant els últims anys està prenent el seu estudi. Són un grup heterogeni d'autoanticossos adquirits de forma espontània, de tipus IgG, IgM o IgA, que es caracteritzen per anar dirigits contra estructures fosfolipídiques de càrrega negativa de les membranes cel·lulars.

Recentment s'ha observat que els malalts amb LES i AAF presenten una alta incidència de fenòmens trombòtics, avortaments

i morts fetals de repetició i trombocitopènia. Tanmateix, alguns autors han observat una correlació significativa entre els nivells d'AAF i l'activitat clínica del LES, de forma que la seva determinació podria introduir un nou element per a millorar la monitorització del LES.

La seva detecció ha vingut realitzant-se des de la dècada dels cinquanta de forma indirecta mitjançant diverses tècniques. Les més clàssiques són les proves coagulomètriques, que detecten anticossos dirigits contra la fracció fosfolipídica del complex protrombinasa i que reben el nom genèric d'anticoagulant lúpic (AL). Un altre mètode clàssic, però també indirecte, per a la determinació d'AAF consisteix en la detecció d'una serologia luètica falsament positiva (SLFP) mitjançant tècniques reagíniques (VDRL, RPR) que posen de manifest la presència d'anticossos dirigits contra una mescla de cardiolipina, lecitina i colesterol.

Els últims anys, però, han estat introïduïdes diverses tècniques immunològiques, com el radioimmunoassaig (RIA) i l'enzimoimmunoassaig (ELISA), per a la determinació de forma directa dels AAF. Aquestes tècniques han permès el reconeixement de diversos tipus d'aquests anticossos (anticossos anticardiolipina-AAC, antifosfatidilserina, antifosfatidilinositol, anti-àcid fosfatídic, etc).

De tots ells, els AAC han estat els que han meregut un major interès per part dels investigadors. Així, actualment es considera

que la detecció d'aquests autoanticossos per la tècnica d'ELISA aporta molts avantatges en el camp d'investigació dels AAF. No obstant això, fins el moment actual no han estat efectuats estudis prospectius en poblacions àmplies de malalts afectes de LES determinant els AAC mitjançant aquesta tècnica i persisteixen encara moltes incògnites respecte a la seva metodologia de realització i valoració dels resultats, així com sobre la seva incidència i relació amb les diverses manifestacions clíniques i biològiques del LES.

Amb la base de les observacions anteriors, els objectius de la present Tesi Doctoral van ser els següents: D'una banda, posar a punt i desenvolupar la tècnica d'ELISA de detecció dels AAC, assignar als resultats unes unitats de càlcul senzill i determinar els valors de normalitat; en segon lloc, conèixer la incidència dels AAC en el LES i la seva relació amb la presència de fenòmens trombòtics, avortaments de repetició, trombocitopènia i altres manifestacions clíniques i biològiques del LES, amb la finalitat de comprovar si defineixen algun subgrup clínic; en tercer lloc, valorar l'interès dels AAC com a paràmetre d'activitat del LES; i, finalment, comparar la presència d'AAC amb la de l'AL i la SLFP.

Per a portar a terme aquest estudi, han estat analitzats de forma prospectiva durant 2 anys (1986-87) 100 malalts diagnosticats de LES en base als criteris de l'ARA. Com a grups control han estat utilitzats, d'una banda, 107 malalts amb diverses altres patologies autoimmunes (esclerosi sistèmica

progressiva, dermatomiositis-polimiositis, artritis reumatoïde, arteritis de Horton, cirrosi biliar primària i púrpura trombocitopènica idiopàtica) i, per altra part, 100 persones sanes donants voluntaris de sang amb serologia luètica negativa.

L'obtenció de les dades es va portar a terme aplicant un protocol clínico-biològic, realitzat per la mateixa persona. La determinació dels AAC va ser realitzada personalment segons la tècnica d'ELISA en fase sòlida descrita originalment per Loizou et al, amb diverses modificacions destinades a optimitzar la metodologia. La determinació de l'AL també va ser realitzada per la mateixa persona aplicant diverses tècniques coagulomètriques dependents de fosfolípids (temps de protrombina, temps de tromboplastina parcial activat, temps d'inhibició de la tromboplastina tissular diluïda, temps de caolí i temps del verí d'escurçó de Russell diluït) amb les confirmacions posteriors mitjançant incubacions amb plasma normal i neutralització amb plaquetes. La serologia luètica va ser determinada per la prova reagínica d'aglutinació en porta anomenada RPR. La resta de paràmetres biològics i immunològics es va determinar segons les tècniques habituals estandarditzades a l'Hospital Clínic.

Dels resultats obtinguts en el present estudi es desprenen les següents conclusions:

1. Anàlisi clínica de la sèrie

1.1. La distribució per sexes, edat d'inici de la malaltia, manifestacions clíniques i incidència de nefropatia van ser similars a les descrites a la literatura.

2. Estudi dels anticossos anticardiolípicina

2.1. Estandardització de la tècnica d'ELISA

2.1.1. La tècnica d'ELISA en fase sòlida que utilitza cardiolípicina com a antigen i dos pisos d'anticossos, l'últim dels quals conjugat amb fosfatasa alcalina, permet detectar AAC dels isotipus IgG i IgM de forma estandarditzada i reproductible.

2.1.2. Amb la introducció d'alguna modificació respecte a la descripció original de Loizou et al., com és la utilització de 1,5 ug de cardiolípicina a cada pouet de la placa d'ELISA, s'ha obtingut al nostre laboratori una millor capacitat de la tècnica per a distingir entre la presència de diverses quantitats d'anticossos.

2.1.3. La utilització de l'índex d'unió (IU) permet assignar als resultats unes unitats de càlcul senzill. La unitat (1 U.) equival a una densitat òptica (DO) del sèrum problema igual a la DO del grup control sa.

2.1.4. Els valors dels AAC a la població sana segueixen una distribució log-normal, amb diferències segons l'isotipus (IgG o IgM).

2.1.5. Per a computar els valors patològics és necessari considerar només aquells superiors a 2,8 U. (3,76 DE) en el cas dels AAC-IgG i a 4,07 U. (3,89 DE) en el dels AAC-IgM.

2.2. Incidència dels anticossos anticardiolipina

2.2.1. La incidència dels AAC al LES és relativament alta (36 % a la nostra sèrie).

2.2.2. La incidència a altres malalties sistèmiques immunològiques com l'esclerosi sistèmica progressiva, la dermatomiositis-polimiositis, l'arteritis de Horton o la púrpura trombocitopènica idiopàtica és escassa. La incidència a l'artritis reumatoïde i a la cirrosi biliar primària és més elevada, el que suggereix una possible reacció creuada amb el factor reumatoïde i els anticossos antimitocondrials.

2.3. Associació dels anticossos anticardiolipina amb manifestacions clíniques i biològiques del LES

2.3.1. Els AAC presenten una associació estadísticament significativa amb la presència de fenòmens trombòtics. Els malalts amb una major incidència de trombosis són aquells amb un títol més elevat d'AAC de l'isotipus IgG.

2.3.2. Cap malalta de la nostra sèrie no va presentar un avortament durant el període d'estudi. Per altra part, no s'ha observat associació entre els AAC i l'antecedent d'avortaments o morts fetals recurrents.

2.3.3. Els AAC presenten també una associació significativa amb la presència de trombocitopènia. Els malalts amb una major incidència d'aquesta alteració són aquells amb un títol més elevat d'AAC de l'isotipus IgG.

2.3.4. Els AAC de l'isotipus IgM presenten una associació significativa amb la presència d'anèmia hemolítica autoimmune i neutropènia. La major incidència d'aquestes alteracions és també en aquells malalts amb un títol més elevat d'aquests anticossos.

2.3.5. Els AAC tenen una sensibilitat en la detecció d'activitat clínica del LES del 52 %, una especificitat del 75 %, un valor de predicció positiva del 58 % i de predicció negativa del 70 % i una eficàcia del 66 %. No obstant, són marcadors de

trombocitopènia i d'anèmia hemolítica, per la qual cosa no s'haurien de fer servir com a marcadors generals d'activitat clínica del LES.

6.3.6. La detecció d'un títol positiu d'AAC s'associa de forma estadísticament significativa amb la detecció d'AL. No obstant, alguns malalts presenten positivitat de només un d'ells.

6.3.7. La detecció de SLFP és freqüent en el LES i en moltes ocasions s'associa a un títol positiu d'AAC.

6.3.7. El títol dels AAC presenta una correlació significativa amb el dels anticossos anti-ADNn, el que suggereix que un subgrup d'aquests anticossos podria tenir activitat antifosfolipídica.

6.3.8. No ha estat trobada en aquest estudi cap associació significativa entre els AAC i els anticossos anti-ENA o els factors del complement.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Fukase M. Systemic lupus erythematosus. A: Fukase M, ed. Systemic lupus erythemaosus. Baltimore, University Park Press 1980: VII-XIII.
2. Steinberg AD. Studies of immune regulation. A: Decker JL. Moderator. Systemic lupus erythematosus: evolving concepts. Ann Intern Med 1979; 91: 587-604.
3. Alarcón Segovia D. Cellular immunity and its regulation in SLE. Clin Rheum Dis 1982; 8: 63-75.
4. Morrow WJW, Youinou P, Isenberg DA, Snaith ML. Systemic lupus erythematosus: 25 years of treatment related to immunopathology. Lancet 1983; II: 206-210.
5. Steinberg AD, Ravech ES, Laskin CA, Miller ML, Steinberg RT. Genetic, enviromental and cellular factors in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 734-743.
6. Steinberg AD, Howard RS, Laskin CA, Steinberg BJ, Smolen JS. Studies of immune abnormalities in systemic lupus erythematosus. Am J Kidney Dis 1982; 2 (sup 1): 101-110.
7. Tron F. La surveillance immunologique des malades atteints de lupus érythemateux disséminé. Nouv Presse Med 1980; 9: 1619.1621.
8. Brentjens JR, Andres GA. The pathogenesis of extrarenal lesions in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1977; 20: 829-833.

9. Hughes CRV, Harris EN, Gharavi AE. Antiphospholipid antibodies. A: Gupta S, Talal N, ed. Immunology of Rheumatic Diseases. Nova York, Londres, Plenum Medical Book Company 1985; 251-169.
10. Gastinau DA, Kazmier FJ, Nichols WL, Bowie EJW. Lupus anticoagulant: an analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases. Am J Hematol 1985; 19: 265-275.
11. Asherson RA, Harris EN. Anticardiolipin antibodies: clinical associations. Postgrad Med J 1986; 62: 1081-1087.
12. Thiagarajan P, Shapiro SS, DeMarco L. Monoclonal immunoglobulin M coagulation inhibitor with phospholipid specificity. J Clin Invest 1980; 66: 397-405.
13. Colaço CB, Elkon KB. The lupus anticoagulant. Arthritis Rheum 1985; 28: 67-74.
14. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. Br Med J 1983; 287: 1088-1089.
15. Leung ACT. Thrombosis in systemic lupus erythematosus. Br Med J 1983; 287: 1128.
16. Isenberg DA, Colaço CB, Dudeney C, Todd-Pokropek A, Snaith ML. The relationship of anti-DNA antibody idiotypes and anticardiolipin antibodies to disease activity in systemic lupus erythematosus. Medicine (Baltimore) 1986; 65: 46-55.
17. Eilat D, Zlotnick AY, Fischel R. Evaluation of the cross-reaction between DNA and anticardiolipin antibodies in SLE and experimental animals. Clin Exp Immunol 1986; 65: 269-278.
18. Rauch J, Tannerbaun IT, Stollar BD, Schwartz RS.

Monoclonal anticardiolipin antibodies bind to DNA. Eur J Immunol 1984; 14: 529-534.

19. Green D, Hougie C, Kazmier FJ, Lechner K, Mannucci PM, Rizza CR, Sultan Y. Report of the working party on acquired inhibitors of coagulation: studies of the lupus anticoagulants. Thromb Haemost 1983; 49: 144-146.

20. Thiagarajan P, Shapiro SS. Lupus anticoagulants. A: Colman RW ed. Methods in hematology: disorders of thrombin formation other than hemophilia. Nova York, Livingston 1983; 101-108.

21. Triplett DA, Brandt JT, Maas RL. The laboratory heterogeneity of lupus anticoagulants. Arch Pathol Lab Med 1985; 109: 946-951.

22. Brandt JT, Triplett DA, Musgrave K, Orr C. The sensitivity of different coagulation reagents to the presence of lupus anticoagulants. Arch Pathol Lab Med 1987; 111: 120-124.

23. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds A, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin Exp Immunol 1985; 62: 738-745.

24. Quamar T, Goei S, Lockshin M. Assay characteristics and cross-reactivity of antibody to cardiolipin. Arthritis Rheum 1986; 29: S13 (abstract).

25. Talbott JH. Systemic lupus erythematosus. A: Talbott JH ed. Collagen vascular diseases. Nova York, Grune-Stratton 1974: 1-88.

26. Fries JF, Holman HR. Major problems in Internal Medicine: Systemic lupus erythematosus. A clinical analysis. Philadelphia, Saunders WB. 1975.
27. Godeau P, Herreman G, Wechsler B. Le lupus érythémateux. Historique et évolution des idées. Rev Prat 1976; 26: 923-925.
28. Talbott JH. Historical background of discoid and systemic lupus erythematosus. A: Dubois EL, ed. Lupus erythematosus. 2nd ed. Los Angeles, University Southern California Press 1976: 1-11.
29. Klemperer P, Pollack AD, Baehr G. Pathology of disseminated lupus erythematosus. Arch Path 1941; 32: 569-631.
30. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell and "LE" cell. Proc Staff Meet Mayo Clin 1948; 23: 25-28.
31. Friou GJ. Clinical application of lupus serum-nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. J Clin Invest 1957; 36: 890.
32. Friou GJ. Immunofluorescence and antinuclear antibodies. Arthritis Rheum 1964; 7: 161-166.
33. Dixon FJ, Andrews BS, Eisenberg RA et al. Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus like syndrome in mice. Arthritis Rheum 1978; 21 (sup): S64-S67.
34. Stevens MB. Systemic lupus erythematosus clinical issues. Springer Semin Immunopathol 1986; 9: 251-270.
35. Hahn BH. Systemic lupus erythematosus. A: Parker CHW, ed. Clinical immunology, Philadelphia. WB Saunders 1980: 585-631.
36. Steinberg AD. Modern concepts of systemic lupus erythematosus. Prog Clin Rheumatol 1987; 1: 1-31.

37. Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, Arnett FC, Bias WB, Provost TT, Stevens MB. Systemic lupus erythematosus: A review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64: 285-295.

38. Mannik M. Pathophysiology of circulating immune complexes. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 783-787.

39. Blaese M, Broder S, Krakauer RS. Disorders of suppressor immunoregulatory cells in the pathogenesis of immunodeficiency and autoimmunity. A: Waldmann TA. Moderator. *Ann Intern Med* 1978; 88: 226-238.

40. Dubois EL, Wallace DJ. Clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus. A: Dubois EL, ed. *Lupus erythematosus*. 3r.ed. Lea & Febinger, Philadelphia, 1987: 317-449.

41. Rothfield N. Clinical features of systemic lupus erythematosus. A: Kelly NW, Harris D, Ruddys S, Sledge BC, eds. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia. WB Saunders 1980: 1106-1132.

42. Meyer D, Margulis J, Kahn MF. Lupus éryhémateux disséminé. A: Kahn MF, Peltier AP, ed. *Maladies dites systémiques*. Paris, Flammarion 1983: 202-295.

43. Steinberg AD. Systemic lupus erythematosus. A: Wyngaarden JB, Smith LLH, ed. *Cecil's textbook of Medicine*. 17ed. Philadelphia. WB Saunders 1985: 1924-1932.

44. Estes D, Christian CL. The natural history of systemic

lupus erythematosus by prospective analysis. *Medicine* 1971; 50: 85-95.

45. Manolius N, Schrieber L. Current concepts in the etiopathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *Aust NZ J Med* 1986; 16: 729-743.

46. Zvaifler NJ. Etiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus. A: Kelly NW, Harris D, Ruddy S, Sledge BC, ed. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia. WB Saunders 1980: 1079-1105.

47. Christian CL. Systemic lupus erythematosus. Clinical manifestations and prognosis. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 887-888.

48. Walport MJ, Black CM, Batchelor JR. The immunogenetics of SLE. *Clin Rheum Dis* 1982; 8: 3-21.

49. Alarcón-Segovia D, Díaz-Jouanen E. Subgrupos del lupus: su relación con factores genéticos y ambientales. *Rheum Rev Rep* 1983; 3: 409-416.

50. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM et al. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. Correlation with clinical features. *Am J Med* 1982; 72: 783-790.

51. Gaudreau A, Amor B, Kahn MF et al. Clinical significance of antibodies to soluble extractable nuclear antigens (anti-ENA). *Ann Rheum Dis* 1978; 37: 321-327.

52. Clotet B, Guardia J, Pigrau C et al. Incidence and clinical significance of anti-ENA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumat* 1984; 13: 15-20.

53. Beaufils M, Kouk F, Mignon et al. Significado clínico de los anticuerpos anti-Sm en el lupus eritematoso sistémico. Am J Med (ed. esp.) 1983; 17: 101-105.

54. Coca A, Font J, Pastor M et al. Incidence and clinical significance of the ENA-antibodies (Sm, RNP, SS-B) in systemic lupus erythematosus. XVII International Congress of Internal Medicine. Kyoto 1984. Abstract; 276.

55. Fishbein E, Alarcón-Segovia D, Vega JM. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 1979; 36: 145-150.

56. Rubin RL, Joslin FG, Tan EM. Specificity of antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 779-782.

57. Sontheimer RD, Maddison PJ, Reichlin M et al. Serologic and HLA association in subacute cutaneous lupus erythematosus. A clinical subset of lupus erythematosus. Ann Intern Med 1982; 97: 664-671.

58. Westen WL, Harman C, Peebles C et al. Serologic marker for neonatal lupus erythematosus. Br J Dermatol 1982; 107: 377-382.

59. Sakane T, Steinberg AD, Green I. Studies of immune functions to patients with SLE. Failure of suppressor T cell activity related to impaired generation of, rather than response to, suppressor cells. Arthritis Rheum 1978; 21: 657-664.

60. Font J, Cardellach F. Lupus eritematoso sistémico: ¿enfermedad o síndrome? Med Clin (Barce) 1985; 84: 657-659.

61. Smolen JS, Steinberg AD, Chused TM. The lupus subset idea. A: Smolen JS, Zielinsky CC. Systemic lupus erythematosus. Clinical and experimental aspects. Springer-Verlag, Londres, 1987; 290-297.

62. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 1973; 3: 1-54.

63. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Arch Intern Med 1974; 134: 1027-1031.

64. Bach JF, Tron F, Bach MA. Les nouvelles conceptions de l'autoimmunité et du lupus érythémateux disséminé. Actualités Néphrol Hôpital Necker. Paris, Flammarion. 1976: 7-33.

65. Schur PH, Carpenter CB. Sharing of HLA haplotype by parents of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1983; 26: 1104-1110.

66. Schur PH, Meyer I, Garovoy M, Carpenter CB. Associations between systemic lupus erythematosus and the major histocompatibility complex. Clinical and immunological considerations. Clin Immunopathol 1982; 22: 263-275.

67. Gibofsky A, Winchester R, Hausen J et al. Contrasting patterns of newer histocompatibility determinants in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1978; 21: S134-S138.

68. Scherak O, Smolen JS, Mayr WR. Prevalence of HLA-DR_w not increased in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 1979; 301: 612.

69. Celada A, Barras C, Benzonana G, Jeannet M. Increased

frequency of HLA-DR₃ in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 1980; 15: 283-288.

70. Bell DA, Maddison PJ. Serologic subsets in systemic lupus erythematosus: an examination of autoantibodies in relationship to clinical features of disease and HLA antigens. Arthritis Rheum 1980; 23: 1268-1273.

71. Schur P, Meyer IL, Carpenter CB, Garovoy MR. Systemic lupus erythematosus and the major histocompatibility complex (MHC). Arthritis Rheum 1981; 24 (sup): S32.

72. Rigby RJ, Dawkins RL, Wetherall JD, Hawkins BR. HLA in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 1978; 12: 25-31.

73. Stastny P. Genetic control of the immune response and the susceptibility for rheumatoid arthritis, lupus erythematosus and related diseases. A: Franklin EC ed. Clinical Immunology Update. Edinburgh, Churchill Livingstone 1981: 31-57.

74. Stastny P. HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1978; 21: S139-143.

75. Ahearn JM, Provost TT, Dorsch CA et al. Interrelationships of HLA-DR, MB and MT phenotypes, autoantibody expression and clinical features in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 1031-1040.

76. Reinertsen JL, Klippel JH, Johnson AH, Steimberg AD, Decker ML, Mann DL. B-lymphocyte alloantigens associated with systemic lupus erythematosus. N Eng J Med 1978; 299: 515-518.

77. Mayes E, Fuchs S. Linkage between immune response potential to DNA and X chromosome. Nature 1974; 249: 167-169.

78. Lawless DJ, Metz S, Light JA, Berne BH, Strong DM. Association of HLA-DR₃ with antibodies to native DNA and a subset of systemic lupus erythematosus patients with nephritis. *Arthritis Rheum* 1981; 24:S108.

79. Shulman LE. Familial studies in SLE. A: Fukase M ed. *Systemic lupus erythematosus*. Baltimore, University Press 1980: 53-57.

80. Alarcón-Segovia D, Díaz-Jouanen E. Lupus subsets and their relationship to genetic and environmental factors. A: Fukase M ed. *Systemic lupus erythematosus*. Baltimore, University Press 1980:53-57.

81. Messner RP, De Horatius RJ. Lymphocyte antibodies in systemic lupus erythematosus patients and their relatives. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 265-272.

82. Lehman TJA, Curd JG, Zvaifler NJ, Hanson V. The association of antibuclear antibodies, antilymphocyte antibodies, and C₃ activation among the relatives of children with systemic lupus erythematosus. Preferential activation of complement in sisters. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 556-561.

83. Reveille JD, Bias WB, Winkelstein JA. Familial systemic lupus erythematosus: immunogenetic studies in eight families. *Medicine (Baltimore)* 1983; 62: 21-35.

84. Schur PH. Complement and lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 793-798.

85. Rynes RI. Inherited complement deficiency states and SLE. *Clin Rheum Dis* 1982; 8: 29-47.

86. Glass D, Raum D, Gibson D, Stillman JS, Schur PH. Inherited deficiency of the second component of complement. Rheumatic diseases associations. J Clin Invest 1976; 58: 854-861.
87. Alper CA, Rosen T. Complement deficiencies in humans. A: Franklin EC ed. Clinical Immunology Update. Edimburgh. Churchill Livingstone 1981: 59-75.
88. Talal N. Sex hormone and modulation of immune response in SLE. Clin Rheum Dis 1982; 8: 23-28.
89. Miller MH, Urowitz MB, Gladman DD, Killinger DW. Systemic lupus erythematosus in males. Medicine (Baltimore) 1983; 62: 327-334.
90. Jungers P, Nahoul K, Pelissier C, Dougados M, Tron F, Bach JF. Low plasma androgens in women with active or quiescent systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 454-457.
91. Imbasciati E, Surian M, Bottino S, et al. Lupus nephropaty in pregnancy. Nephron 1984; 36: 46-51.
92. Jungers P, Dougados M, Pelissier C et al. Influence of oral contraceptive therapy on the activity of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 618-623.
93. Stern R, Fishman J, Brusman H et al. Systemic lupus erythematosus associated with Klinefelter's syndrome. Arthritis Rheum 1977; 20:18-22.
94. Lahita RJ, Bradlow L, Fishman J, Kunkel HG. Estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25:843-846.
95. Lahita Rj, Bradlow HL, Fishman J, Kunkel HG. Abnormal

estrogen and androgen metabolism in the human with systemic lupus erythematosus. *Am J Kid Dis* 1982; 2 (sup): 206-211.

96. Miller M, Urowitz J, Gladman D, Killinger D. Male SLE. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 558.

97. Inman RD, Jovanovic L, Markenson JA et al. Systemic lupus erythematosus. Genetic and endocrine features. *Arch Intern Med* 1982; 142: 1813-1815.

98. Palacios R, Alarcón-Segovia D, Llorente L, Ruiz Argüelles A, Díaz Jouanen E. Human postthymic precursor cells in health and disease. II. Their loss and dysfunction in systemic lupus erythematosus and their partial correction with serum thymic factor. *J Clin Lab Immunol* 1981; 5: 71-80.

99. Bach JF. Le thymus, organe clef de l'immunité. *Nouv Presse Med* 1974; 3: 571-574.

100. Lewis UM, Twomey JJ, Steinberg AD, Goldstein G. Serum thymic hormone activity with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 18: 61-67.

101. Pincus T. Studies regarding a possible function for viruses in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 847-856.

102. Izui S, MacConahey PJ, Clark JP et al. Retroviral gp 70 immune complexes in NZB x NZWF₂ mice with murine lupus nephritis. *J Exp Med* 1981; 154: 517-528.

103. Yoshiki T, Mellors RC, Strand M, August HT. The viral envelope glycoprotein of murine leukemia virus and the pathogenesis of immunocomplex glomerulonephritis of New Zealand mice. *J Exp Med* 1974; 140: 1011-1019.

104. Phillips PE. Type C oncornavirus studies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 576-578.

105. Hazelton RA. A study of lymphocytotoxics in families of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 136-139.

106. Clair D, De Horatius RJ, Wolfe J, Halliwell R. Autoantibodies in human contacts of SLE dogs. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 251-252.

107. Christian CL. Role of viruses in etiology of systemic lupus erythematosus. *Am J Kid Dis* 1982; 2 (sup): 114-118.

108. Tan EM. Sunlight as a potential aetiological factor in systemic lupus erythematosus. A: Hughes GRV ed. *Modern topics in Rheumatology*. Londres. Heinemann 1976: 99-106.

109. Ten Veen JH, Feltkamp TEW. Studies on drug induced lupus erythematosus in mice. I. Drug induced antinuclear antibodies (ANA). *Clin Exp Immunol* 1972; II: 265-276.

110. Hess EV. Drug related lupus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 857.

111. Harman CE, Portanova JP. Drug induced lupus: Clinical and serological studies. *Clin Rheum Dis* 1982; 8: 121-135.

112. Reidenberg MM. Aromatic amines and the pathogenesis of lupus erythematosus. *Am J Med* 1983; 75: 1037-1042.

113. Horowitz DA. Cellular Immunity and rheumatic disease. A: Panayi GS ed. *Scientific basis of Rheumatology*. Edimburgh. Churchill Livingstone 1982: 61-71.

114. Nakamura Z, Asano T, Yano K, Ofugi J. Reevaluation of

suppressor cell function in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol 1982; 23: 72-82.

115. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. Advances in Immunology 1982; 33: 167-239.

116. Hahn BA. Characteristics of pathogenetic subpopulations of antibodies to DNA. Arthritis Rheum 1982; 25:747-752.

117. Helve T, Teppo AM, Wegelius O. Circulating DNA-antibodies in systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int 1982; 2: 103-106.

118. Font J. Anticuerpos linfocitotóxicos y otros parámetros inmunológicos en el lupus eritematoso sistémico. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 1984.

119. De Horatius RJ. Lymphocyte subsets in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 828-832.

120. Morimoto C, Abe T, Toguchi M, Kiyotaki M, Homma M. Studies of antilymphocyte antibody in patients with SLE. Scand J Immunol 1980; 11: 479-488.

121. Moretta A, Mingari MC, Santoli D. Human T-lymphocyte subpopulations: alterations in SLE. Scand J immunol 1979; 10: 223-228.

122. Raveché ES, Steinberg AD. Lymphocytes and lymphocyte function in systemic lupus erythematosus. Sem Hematol 1979; 16: 344-370.

123. Katz P, Zaytoun AM, Lee JH et al. Abnormal natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus: an intrinsic defect in the lytic event. J Immunol 1982; 129: 1966-1971.

124. Karsh J, Dorval G, Kirk C. Natural cytotoxicity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol 1981; 19:437-446.

125. Oshimi K, Sumiya M, Gonda N, Kano S, Takak F. Natural killer cell activity in untreated systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 1982; 41: 417-420.

126. Rook AH, Tsokos GC, Quinnan GV et al. Cytotoxic antibodies to natural killer cells in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol 1982; 20: 179-185.

127. Kaufman DB. Natural killer augmentation in systemic lupus erythematosus via a soluble mediator derived from human lymphocytes. Arthritis Rheum 1982; 25: 562-567.

128. Bennett RS, Gerardi EN, Fields TR, Hamburger MI. Reticuloendotelial system function in man. Plasma Ther Transfus Technol 1983; 4: 119-127.

129. Kimlerly RP, Parris TM, Inman RD, McDougal JS. Dynamics of mononuclear phagocyte system Fc receptor function in systemic lupus erythematosus. Relation to disease activity and circulating immune complexes. Clin Exp Immunol 1983; 51: 261-268.

130. Lawley TJ, Hamburger MI, Brown EJ. Immunoglobulin G Fc receptor-mediated clearance in autoimmune diseases. Ann Intern Med 1983; 98: 206-218.

131. Morgan AG, Steward MW. Macrophage clearance function and immune complex disease in New Zealand black x white F₁ hybrid mice. Clin Exp Immunol 1976; 26: 133-136.

132. Kabbash L, Brandwein S, Esdaile S, Danoff D, Fuks A,

Shuster J. Reticuloendothelial system Fc receptor function in systemic lupus erythematosus. *J Rheum* 1982; 9: 374-379.

133. Wonde FJ, Giessen M, Kallenberg CGM et al. Reticuloendothelial Fc receptor function in SLE patients. I. Primary HLA linked defect or acquired dysfunction secondary to disease activity? *Clin Exp Immunol* 1984; 55: 473-480.

134. Stobo JB. Role of cell mediated immunity in the tissue injury associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Kid Dis* 1982; 2: 111-113.

135. Tsokos GC. Immunologic aspects in humans. A: Balow JE. NIH Conference: Lupus nephritis. *Ann Intern Med* 1987; 106: 79-94.

136. Suesa N. Contribució al coneixement de la regulació de la immuno-resposta per subpoblacions de cèl.lules T. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 1986.

137. Editorial. Monitoring of systemic lupus. *Lancet* 1982; II: 25

138. Cameron JS, Lessof MH, Ogg CS, Williams BD, Williams DG. Disease activity in the nephritis of systemic lupus erythematosus in relation to serum complement concentrations. *Clin Exp Immunol* 1976; 25: 418-427.

139. Davis P, Cumming RH, Verrier J. Relationship between anti-DNA antibodies, complement consumption and circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1977; 28: 226-232.

140. Tron F, Bach JF. Tests immunologiques pour le diagnostic et le pronostic du lupus érythémateux disséminé avant traitement. Intérêt et limites. *Nouv Press Med* 1977; 6: 2573-2578.

141. Claudy AL, Touraine JL, Alario A. Disease activity in systemic lupus erythematosus. Value of laboratory criteria. Clin Exp Dermatol 1979; 4: 435-443.

142. Kalmin ND, Bartholomew WR, Wicher K. Relative values of laboratory assays in systemic lupus erythematosus. Am Soc Clin Pathol 1981; 75: 846-851.

143. Lloyd W, Schur PH. Immunocomplexes, complement and anti-DNA in exacerbations of SLE. Medicine (Baltimore) 1981; 60: 208-217.

144. Morrow WJW, Isenberg DA, Todd A, Parry HF, Snaith ML. Useful laboratory measurements in the management of SLE. Quart J Med 1982; 202: 125-128.

145. Rodríguez V, Peña JL, Orte J et al. Niveles de inmunocomplejos circulantes y de C_3 en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Relación con la actividad clínica y presencia de nefropatía. Med Clin (Barc) 1982; 78: 353-357.

146. Ortega G, Molina M, Bermudo J et al. Comportamiento del C_3 , C_4 y anti-DNA nativo en el curso clínico del lupus eritematoso sistémico. Rev Esp Reumatol 1983; 10: 44-47.

147. Peña JL, Riestra JL, Luceño A et al. Inmunocomplejos circulantes y complemento en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Rev Esp Reumatol 1984; 11: 70-73.

148. Valentijn RM, Overhagen H, Hazewet HM et al. The value of complement and immune complexes determination in monitoring disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1985; 28: 904-913.

149. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277.

150. Abe T, Morimoto C, Toguchi T et al. Functional differences of anti T cell antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and ulcerative colitis. *Scand J Immunol* 1983; 18: 521-530.

151. Takada S, Veda Y, Suzuki N et al. Abnormalities in autologous mixed lymphocyte reaction-activated immunologic processes in systemic lupus erythematosus and their possible correction by interleukin 2. *Eur J Immunol* 1985; 15: 262-267.

152. Lachmann PJ, Hobart MJ. Complement technology 5 A1. *Handbook of experimental immunology*. Vol 1. Londres. Blackwell Scient Publi 1978.

153. Mirapeix E, Borche, Mas P et al. Estudio comparativo entre tres técnicas para la detección de complejos inmunes circulantes. Su aplicación en pacientes afectados de LES. *Immunología* 1981; 1: 19-25.

154. Urowitz MB, Gladman DD, Tozman ECS, Goldsmith CH. The lupus activity criteria count. *J Rheumatol* 1984; 11: 783-787.

155. Theofilopoulos AN. The measurement and significance of immune complexes. A: Franklin CE, ed. *Clinical Immunology Update*. Edimburgh. Churchill Livingstone 1981; 245-291.

156. Font J, Cardellach F, Mirapeix E, Martorell J, Ingelmo M. Inmunocomplejos circulantes en el lupus eritematoso sistémico. *Med Clin (Barc)* 1982; 79: 478.

157. Maury CPJ, Helve T, Sjöblom C. Serum levels of beta-2-microglobulin, sialic acid and C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1982; 2: 145-149.

158. Evrin PE, Strom T. Beta-2-microglobulin and its binding activity in serum from patients with SLE. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 267-274.

159. Font J, Coca A, Molina R, Ballesta A, Cardellach F, Ingelmo M, Balagué A, Balcells A. Serum Beta-2-microglobulin as a marker of activity in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1986; 15: 201-205.

160. Strom T, Ervin PE, Karlsson FA. Serum beta-2-microglobulin in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1978; 7: 97-100.

161. Falus A, Miik A, Permin H, Brandslund I, Svehag SE. High serum beta-2-microglobulin levels and circulating immune complexes containing beta-2-m and beta-2 m antibodies in Felty's syndrome. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 721-727.

162. Karlsson FA, Wibell L, Evrin PE. Beta-2-microglobulin in clinical medicine. *Scand J Clin Lab Invest* 1980; 40 (sup 154): 27-37.

163. Davis P, Percy JS, Rusell AS. Correlation between levels of DNA antyodies and clinical disease activities in SLE. *Ann Rheum Dis* 1977; 36: 157-159.

164. Ludvico CL, Zweiman B, Myers AR, Herbert J, Green PA. Predictive value of anti-DNA antibody and selected laboratory studies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1980; 7: 843.

165. Clotet B, Rubial A, Pigrau C et al. Los anticuerpos anti-DNA nativo en el lupus eritematoso sistémico: estudio retrospectivo en 79 enfermos. *Med Clin (Barc)* 1982; 78: 128-131.

166. Beris PL, Miescher A, Grossiord D, Miescher PA. Clinical aspects of SLE: A longitudinal study of 85 patients. A: Lambert PH, Perrin L, Izui I eds. *Recent advances in SLE*. Londres. Academic Press 1984; 227-291.

167. Baldwin DS, Gallo GR. Lupus nephritis. *Clin Rheum Dis* 1975; 1: 639-663.

168. Bonvoisin B, Boumer M. Diagnostic biologique du pus érythémateuse disséminé. *Sem Hôp Paris* 1983; 59: 1198-1203.

169. Font J, Cardellach F, Martorell J, Molina A, Ballesta AM, Ingelmo M. Valor de los parámetros de laboratorio para la detección de actividad clínica en el lupus eritematoso sistémico. *Rev Clin Esp* 1987; 180: 183-187.

170. Koffler D. Immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rev Med* 1974; 25: 149.

171. Lightfoot RW, Hughes GRV. Significance of persisting serologic abnormalities in SLE. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 837.

172. Appel AE, Sablay LB, Bolden RA, et al. The effect of normalization of serum complement and anti-DNA antibody on the course of lupus nephritis. *Am J Med* 1971; 64: 274.

173. Urowitz MB, Bookman AAM, Koehler BE, et al. The bimodal pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1976; 60: 221.

174. Cheatum DE, Hurd ER, Strunk SW, et al. Renal histology and clinical course of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1973; 16: 670.

175. Townes AS, Steward CR, Osler AG. Immunologic studies of systemic lupus erythematosus. *John Hopkins Med J* 1962; 112: 202-218.

176. Schur PH, Sandson J. Immunological factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1968; 278: 533-538.

177. Schur PH, Austen KF. Complement in the rheumatic diseases. *Bull Rheum Dis* 1971; 22: 666-673.

178. Lewis EJ, Carpenter CB, Schur PH. Serum complement component levels in human glomerulonephritis. *Ann Inter Med* 1971; 75: 555-560.

179. Schur PH. Complement in lupus. *Clin Rheum Dis* 1975; 1: 519-543.

180. Ruddy S, Everson LK, Schur PH, Austen KF. Hemolytic assay of the ninth complement component: evaluation and depletion in rheumatic diseases. *Proceedings of a symposium on immune complexes and diseases. J Exp Med* 1971; 134: 259-275.

181. Appel AE, Sablay LB, Golden RA, Barland P, Grayzel AT, Bank N. The effect of normalization of serum complement and anti-DNA antibody on the course of lupus nephritis. *Am J Med* 1978; 64: 274-283.

182. Swaak AJG, Aarden LA, Staius van Eps LW, Feltkamp TEW. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 226-235.

183. Cohen AS, Reynolds WF, Franklin EG, et al. Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull Rheum Dis* 1971; 21: 643-648.

184. Swaak AJG, Groenwold J, Bronsveld W, Douma J, Feldkamp TEW. Anti-dsDNA and complement profiles in systemic lupus erythematosus. *Neth J Med* 1981; 24: 152-156.

185. Aarden LA, Lakmaker F, de Groot ER. Immunology of DNA. IV. Quantitative aspects of the Farr assay. *J Immunol Methods* 1976; 11: 153-163.

186. Espejo RT, Canelo ES. Properties of bacteriophage PM₂: a lipid containing bacterial virus. *Virology* 1968; 34:738-747.

187. Swaak AJG, Groenwold J, Aarden LA, Statius van Eps LW, Feldkamp TEW. Prognostic value of anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 388-395.

188. Goldstein IN. Clinical applications of complement measurements in rheumatic diseases. *Am J Med Sci* 1975; 269: 172-176.

189. Perrin LH, Lambert PH, Miescher PA. Properdin levels in systemic lupus erythematosus and membranoproliferative glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 1974; 16: 575-581.

190. Williams DG, Peters DK, Fallows S, et al. Studies of serum complement in the hypocomplementemic nephritides. *Clin Exp Immunol* 1974; 18: 391-405.

191. Gewurtz H, Pickering RJ, Mergenhagen SE, Good RA. The complement profile in acute glomerulonephritis systemic lupus erythematosus and hypocomplementemic chronic glomerulonephritis. *Int Arch Allergy* 1968; 34: 566-570.

192. Kohler PF, Ten Bonsel RT. Serial complement component alteration in acute glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1969; 4: 191-202.

193. Alper CA, Rosen FS. Studies of the in vivo behavior of human C₃ in normal subjects and patients. *J Clin Invest* 1967; 46: 2021-2034.

194. Geiger H, Day NK, Good RA. The complement components C₃ and C₇ in sera and urines of patients with chronic proliferative glomerulonephritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1973; 1: 463-471.

195. Koffler D. Laboratory evaluation of systemic lupus erythematosus. A: Lahita RG ed. *Systemic lupus erythematosus*. J Wiley and sons, Inc. Nova York, 1987: 513-516.

196. Swaak AJG, Groenwold J, Bronsveld W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 359-366.

197. Swaak AJG, Statius van Eps LW, Feltkamp TEW. Clinical management of SLE patients. *Neth J Med* 1978; 21: 44-52.

198. Singen BH, Bernstein BH, Kosterking K, Hanson V. Systemic lupus erythematosus in childhood: correlation between changes in disease activity and serum complement levels. *J Pediatr* 1976; 98: 358-365.

199. Cano PO, Jerry LM, Sladowski JP, Osterland CK. Circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1977; 29: 197-204.

200. Rozman C, Montserrat E. Enfermedades de la hemostasis. A: Farreras-Rozman ed. *Medicina Interna*. 11a. ed. Barcelona. Editorial Doyma, 1987: 1599-1621.

201. Conley CL, Hartman RC. A haemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminate lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 631-622.

202. Gladman DD, Urowitz MB. Venous syndromes and pulmonary embolism in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1980; 39: 340-343.

203. Dubois EL. *Lupus erythematosus*. 2nd ed. Los Angeles. University of Southern California Press. 1974:296-305.

204. Moore JE, Lutz WB. The natural history of systemic lupus erythematosus: an approach to its study through chronic biologic false positive reactors. *J Chronic Dis* 1955; 1: 297-316.

205. Canesi BA, Banfi F, Rossi AF, Sinigaglia L. Activation of the coagulation system in connective tissue diseases. *Scand J Rheum* 1980; 9: 266-270.

206. Hasdin JA, Cronlund M, Haber E, Block KJ. Activation of blood clotting in patients with systemic lupus erythematosus. Relationship to disease activity. *Am J Med* 1978; 65: 430-436.

207. Font J, Casals FJ, Bové A et al. Valor del fibrinopéptido A en el control de la actividad del lupus eritematoso sistémico. *Rev Clin Esp* 1986; 178: 203-204.

208. Dodman B, Cunliffe WJ, Roberts BE. Observations on the tissue fibrinolytic activity in patients with cutaneous vasculitis. *Br J Dermatol* 1973; 88: 231-235.

209. Sun NCJ, Conn DL, Schroeter AL, Kazmier FJ. Skin fibrinolytic activity in cutaneous and systemic vasculitis. *Mayo Clin Proc* 1976; 51: 216-221.

210. Angles-Cano E, Sultan Y, Clauvel J. Predisposing factors to thrombosis in systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 1979; 94: 321-323.

211. Chen Y, Hall ER, McLeod B, Wu KK. Accelerated prostacyclin degradation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1981; II: 267-269.

212. Carreras LD, Defreyn G, Machin SJ, Vermylen J, Deman R, Spitz B, Assche AV. Arterial thrombosis, intrauterine death and "lupus" anticoagulant: detection of immunoglobulin interfering with prostacyclin formation. *Lancet* 1981; I: 244-246.

213. Byron MA, Allington MJ, Chapel HM, Mowat AG, Cederholm-Williams SA. Indications of vascular endothelial cell dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 741-745.

214. Byron MA. The clotting defect in SLE. *Clin Rheum Dis* 1982; 8: 137-151.

215. Karpatkin S, Strick N, Karpatkin MB, Siskind GW. Cumulative experience in the detection of antiplatelet antibody in 234 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, systemic lupus erythematosus and other clinical disorders. *Am J Med* 1972; 52: 776-785.

216. Bergström AL, Olsson LB, Kutti J. Platelet survival and platelet production in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheum* 1980; 9: 209-215.

217. Howe SE, Lynch DM. Platelet antibody binding in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14: 482-486.

218. Rauch J, Meng QH, Tannenbaum H. Lupus anticoagulant and antiplatelet properties of human hybridoma autoantibodies. *J Immunol* 1987; 139: 2598-2604.

219. Regan MG, Lackner H, Karpatkin S. Platelet function and

coagulation profile in lupus erythematosus. *Ann Int Med* 1974; 81: 462-468.

220. Zahavi J, Marder VJ. Acquired "storage pool disease" of platelets associated with circulating antiplatelet antibodies. *Am J Med* 1974; 56: 883-890.

221. Humphrey JK, Jacques RJ. The release of histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) from platelets by antigen antibody reactions (in vitro). *J Physiology (London)* 1955; 128: 9-27.

222. Parbtani A, Frampton A, Cameron JS. Platelet and plasma serotonin concentrations in glomerulonephritis II. *Clin Nephrol* 1980; 14: 112-123.

223. Clark WF, Friesen M, Linton AL, Lindsay RM. The platelet as a mediator of tissue damage in immune complex glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1976; 6: 287-289.

224. Mann K. The assembly of blood clotting complexes on membranes. *TIBS* 1987; 12: 229-233.

225. Sargent JS, Sherman RL, Mondhry H. Fibrinogen catabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 19: 195-198.

226. Breckenridge RT, Ratnoff OD. Studies on the site of action of a circulating anticoagulant in disseminated lupus erythematosus. Evidence that this anticoagulant inhibits the reaction between activated Stuart factor (factor X) and proaccelerin (factor V). *Am J Med* 1963; 35: 813-819.

227. Kociba GJ, Loeb WF, Wall RL. Development of procoagulant (tissue thromboplastin) activity of leucocytes. *J Lab Clin Med* 1972; 79: 78-82.

228. Niemetz J, Marcus AJ. The stimulatory effect of platelet and platelet membranes on the procoagulant activity of leucocytes. *J Clin Invest* 1974; 54: 1437-1439.

229. Harberk RJ, Bardana EJ, Komler PF, Carr RI. DNA-anti-DNA complexes, their detection in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1973; 52: 789-793.

230. Arnalich F, Gil A, Enríquez L, Navarro JL, Barbado FJ, Vázquez JJ. Estudio de la coagulación plasmática y de la fibrinólisis en el lupus eritematoso sistémico (LES). *Med Clin (Barc)* 1979; 73: 5-10.

231. Sam WM, Throne EG, Small P et al. Leukocytoclastic vasculitis. *Arch Dermatol* 1976; 112: 219-226.

232. Durán-Suárez JR. Anticoagulantes circulantes en el lupus eritematoso sistémico. *Med Clin(Barc)* 1983; 81: 203-206.

233. Castro D, Farber LR, Clyne LP. Circulating anticoagulants against factors IX and XI in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1972; 77: 542-548.

234. Cronberg S, Nilsson IM. Circulating anticoagulants against factors XI and XII together with massive spontaneous platelet aggregation. *Scand J Haematol* 1973; 10: 208-314.

235. Aberg H, Nilsson IM. Recurrent thrombosis in a young woman with circulating directed factors XI and XII. *Acta Med Scand* 1972; 192: 419-425.

236. Bajaj SP, Rappaport SI, Fierer DS, Herbst KD, Schwartz DB. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983; 61: 684-692.

237. Chagnon A, Peres C, Camelliri G, Abgrall J, Verdier M. Syndrome lupique induit par la quinidine. Avec thrombophlébite à bascule et anticoagulant circulant antifacteur IX. Presse Med 1981; 10: 2991-2992.

238. Reece EA, Clyne LP, Romero R, Hobbins JC. Spontaneous factor XI inhibitors. Arch Intern Med 1984; 144: 525-529.

239. Durán JR, Vilaseca J, Ordeig J, Triginer J. Anticoagulante dirigido contra el factor XI. Sangre (Barc) 1981; 26: 631-637.

240. Ordi J. Valor clínico del anticoagulante lúpico. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 1984.

241. Boey ML, Colaço CB, Gharavi AE, Elkon KB, Loizou S, Hughes GRV. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Br Med J 1983; 287: 1021-1023.

242. Gazendel C, Dougados M, Kremp O, Tron F, Noel LH, Jungers P. Anticoagulants circulants d'activité antiprothrombinase au cours du lupus érythémateux disséminé. Nouv Presse Med 1980; 9: 2325-2328.

243. Feinstein DL, Rapaport SL. Acquired inhibitors of blood coagulation. A: Progress in Hemostasis and Thrombosis. Spaet TN ed. Nova York, Grune and Stratton 1972; I: 79-95.

244. Veltkamp JJ, Kerkhoven P, Loeliger EA. Circulating anticoagulant in disseminated lupus erythematosus: Proposed mode of action. Haemostasis 1974; 2: 253-259.

245. Shapiro SS, Thiagarajan P. Lupus anticoagulants. Prog Hemostasis Thromb 1982; 6: 263-285.

246. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol* 1941; 48: 484-486.

247. De Bruijn JH. Chemical structure and serological activity of natural and synthetic cardiolipin and related compounds. *Br J Vener Dis* 1966; 42: 125-128.

248. Inoue K, Nojima S. Immunochemical studies of phospholipids. IV: The reactivities of antisera against natural cardiolipin and synthetic cardiolipin analogues-containing antigens. *Chem Phys Lipids*. 1969; 3: 70-77.

249. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-1214.

250. Harris EN, Gharavi AE, Loizou S, Derve G, Chan JK, Patel BM, Mackworth-Young CG, Bunn CC, Hughes GRV. Crossreactivity of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985; 16: 1-6.

251. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 1-6.

252. Lafer EM, Rauch J, Andrzejewski C, Mudd D, Furie B, Schwarz RS, Stollar BD. Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J Exp Med* 1981; 153: 897-909.

253. Shoenfeld Y, Rauch J, Massicotte H, Datta SK, Andre-Schwarz J, Stollar BD, Schwarz RS. Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies produced by human-human hybridomas. *N Eng J Med* 1983; 308: 414-420.

254. Koike T, Sevishi M, Funaki H, Tomioka H, Yoshida S. Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 193-199.

255. Koike T, Maruyama N, Funaki H, Tomioka H, Yoshida S. Specificity of mouse hybridoma antibodies to DNA. II. Phospholipid reactivity and biological false positive serological test for syphilis. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 345-350.

256. Aggeler PM, Lindsay S, Lucia SP. Studies on the coagulation defect in a case of thrombocytopenic purpura complicated by thrombosis. *Am J Pathol* 1946; 22: 1181-1203.

257. Boxer M, Ellman L, Carvalho A. The lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 1244-1248.

258. Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med* 1980; 92: 156-159.

259. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, Pange PJE, Goudevenos J, Moutsopoulos HM. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 1987; 69: 557-565.

260. Mackworth-Young C, Chan J, Harris EN, Walport M, Bernstein R, Batchelor R, Hughes GRV, Gharavi A. High incidence of anticardiolipin antibodies in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14: 723-726.

261. Bloom EJ, Abrams DI, Rodgers G. Lupus anticoagulant in the acquired immunodeficiency syndrome. *JAMA* 1986; 256: 491-493.

262. Freyssinet JM, Cazenave JP. Lupus-like anticoagulants,

modulation of the protein C pathway and thrombosis. *Thromb Haemostas* 1987; 58: 679-681.

263. Borrell M, De Castellarnau C. Anticoagulante tipo lupus. *Sangre* 1985; 30: 802-811.

264. Frick PG. Acquired circulating anticoagulants in systemic "collagen disease": Autoimmune thromboplastin deficiency. *Blood* 1955; 10: 691-706.

265. Laurell AB, Nilsson IM. Hypergammaglobulinemia, circulating anticoagulant, and biologic false positive Wasserman reaction: A study of two cases. *J Lab Clin Med* 1957; 49: 694-707.

266. Medal LS, Lisker R. Circulating anticoagulants in disseminated lupus erythematosus. *Br J Haematol* 1959; 5: 284-293.

267. Yin ET, Gaston LW. Purification and kinetic studies on a circulating anticoagulant in a suspected case of lupus erythematosus. *Throm Diathes Haemostas* 1965; 14: 88-115.

268. Lechner K. A new type of coagulation inhibitors. *Thromb Diathes Haemorrh* 1969; 21: 482-499.

269. Gonyea L, Herdman R, Bridges RA. The coagulation abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Thromb Diathes Haemorrh* 1968; 20: 457-464.

270. Lee SL, Sanders M. A disorder of blood coagulation in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1955; 34: 1814-1822.

271. Lee SL, Miotti AB. Disorders of hemostatic function in patients with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1975; 4: 241-252.

272. Editorial. Lupus anticoagulant. *Lancet* 1984; 1: 1157-1158.

273. Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. Studies on phospholipids in the action of a lupus coagulation inhibitor. Pathology 1975; 7: 319-328.

274. Coots MC, Miller MA, Glueck HI. The lupus inhibitor. A study of its heterogeneity. Thromb Haemostas 1981; 46: 734-739.

275. Firkin BG, Booth P, Hendrix L, Howard MA. Demonstration of a platelet by-pass mechanism in the clotting system using an acquired anticoagulant. Am J Hematol 1978; 5: 81-92.

276. Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. Br J Haematol 1978; 40: 143-151.

277. Howard MA, Firkin BG. Investigations of the lupus-like inhibitor by passing activity of platelets. Thromb Haemostas (Stuttgart) 1983; 50: 775-779.

278. Exner T. Similar mechanism of various lupus anticoagulants. Thromb Haemost 1985; 18: 15-16.

279. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS, Heine M. Immunological specificity and mechanisms of action of IgG lupus anticoagulants. Blood 1987; 70: 69-76.

280. Rosner E, Pazner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. Thromb Haemostas 1987; 57: 144-147.

281. Rivard GE, Schiffman S, Rapaport SI. Cofactor of the lupus anticoagulant. Thromb Diath Haemorrh 1974; 32: 554-563.

282. Loeliger A. Protrombin as cofactor of circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Thromb Diath Haemorrh 1959; 3: 237-256.

283. Catterall RD. Biological false positive reactions and systemic disease. A: Walter G ed. Symposium on Advanced Medicine. Pitman Medical, Londres 1973: 97-111.

284. Shulman LE. Systemic lupus erythematosus and the chronic biologic false positive test for syphilis. A: Dubois EI ed. Lupus Erythematosus. 3rd. ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1987: 262-270.

285. MacFarlane MG, Gray GM. Composition of cardiolipin. Biochem J 1957; 67: 25.

286. Gray GM, MacFarlane MG. Separation and composition of the phospholipids of ox heart. Biochem J 1958; 70: 409-433.

287. MacFarlane MG, Wheeldon LW. Position of the fatty acids in cardiolipin. Nature 1958; 108: 1808.

288. Moore JE, Mohr CF. Biologically false positive serologic tests for syphilis. Type, incidence and cause. JAMA 1952; 150: 467-473.

289. Nelson RA, Mayer MM. Immobilization of treponema pallidum "in vitro" by antibody produced in syphilitic infection. J Exp Med 1949; 89: 369.

290. Nelson RA, Zhuetlin HEC, Diesendrick J, Austin PA. Studies on treponemal immobilizing antibodies in syphilis. Ann J Syph Gonorr Vener Dis 1950; 34: 101.

291. Harvey AM, Shulman LE. Connective tissue disease and chronic biologic false positive tests for syphilis (BFP reaction). Med Clin North Am 1966; 50: 1271-1279.

292. Berlund S, Carlsson M. Clinical significance of chronic

biologic false positive Wasserman reaction and "antinuclear factors". Acta Med Scand 1966; 180: 407-412.

293. Weupper KD, Bodily HL, Tuffanelli DL. Serologic tests for syphilis and the false-positive reactor. Arch Dermatol 1966; 94: 152-155.

294. Putkonen T, Jokinen EJ, Mustakallio KK. Chronic biologic false positive seroreactions for syphilis as a harbinger of systemic lupus erythematosus. Arch Derm Vener 1967; 47: 83-88.

295. Tuffanelli DL. False positive reactions for syphilis: Serological abnormalities in relatives of chronic reactors. Arch Dermatol 1968; 98: 606-611.

296. Fowler E, Allen RH. Studies on the production of Wasserman reagin. J immunol 1962; 88: 591-594.

297. Inove K, Nojima S. Immunochemical studies of phospholipids. I. Reactivity of various synthetic cardiolipin derivatives with Wasserman antibody. Chem Phys Lipids 1967; 1: 360-367.

298. Inove K, Nojima S. Immunochemical studies of phospholipids. II. Production of antibody to cardiolipin. Biochim Biophys Acta 1967; 144: 409-414.

299. Aho K. Studies of syphilitic antibodies. Br J Vener Dis 1968; 44: 283-286.

300. Tamamura S, Hashimoto T, Hara I. The immunological reactions between acidic phospholipids and their antibodies. Jpn J Exp Med 1971; 41: 31-38.

301. Wicken AJ, Gibbens JW, Knox KW. Anti-techoic acid

antibodies and non-treponemal serological tests for syphilis. *Infect Immun* 1972; 5: 982-984.

302. De Siervo AJ. Anti-cardiolipin and anti-phosphatidylglycerol antibodies prepared against bacterial phospholipids. *Infect Immun* 1974; 9: 835-838.

303. Guarnieri M. Reaction of cardiolipin and phosphatidylinositol antisera with phospholipids antigens. *Lipids* 1974; 9: 602-695.

304. Cooper MR, Cohen HJ, Huntley CC, Waite BM, Spees L, Spurr L. A monoclonal IgM with antibody-like specificity for phospholipids in a patient with lymphoma. *Blood* 1974; 43: 493-504.

305. Alving C. Immune reactions of lipids and lipid model membranes. A: Sela M ed. *The antigens*. Academic Press, Nova York, 1977: 1-56.

306. Faure M, Coulon-Morelec M. Entre la structure chimique du cardiolipide et son activité serologique. *Conservation du cardiolipide*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1963; 104: 246-261.

307. Guarnieri M, Eisner D. A DNA antigen that reacts with antisera to cardiolipin. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 58: 347-353.

308. Koike T, Tomioka H, Kumagai A. Antibodies cross-reactive with DNA and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 298-302.

309. Tincani A, Meroni PL, Mantelli PG, Balestrieri G. Anti-phospholipid antibodies: their relationship with anti-DNA and anti-mitochondrial activity. *ANA symposium*. Lenven, Belgique. 1984.

310. Morgan A, Thompson S, Rogers LA, Stafnes NA. Specificity of murine monoclonal anti-DNA autoantibodies: Reactivity with nucleotides, nucleosides and phospholipids. British Society of Immunology Meeting, Spring. 1983.

311. Fiumara NS. Biologic false-positive reaction for syphilis. N Eng J Med 1963; 268: 402-405.

312. Wright DJM, Doniach D, Lessof MH, Turk JL, Grimble AS, Catterall RD. New antibody in early syphilis. Lancet 1970; 1: 740-743.

313. Labro MT, Andreu M, Weber M, Homberg JC. A new pattern of non-organ and non-species-specific anti-organelle antibody detected by immunofluorescence: the mitochondrial antibody number 5. Clin Exp Immunol 1978; 31: 357-366.

314. Johansson EA, Lassus A. The occurrence of circulating anticoagulants in patients with syphilitic and biologically false positive antilipoidal antibodies. Ann Clin Res 1974; 6: 105-108.

315. Jaffe HW. The laboratory diagnosis of syphilis: New concepts. Ann Intern Med 1975; 83: 846.

316. Vermylen J, Blockmans D, Spitz B, Deckmyn H. Thrombosis and immune disorders. Clin Haematol 1986; 15: 393-412.

317. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: The protein C system. N Eng J Med 1986; 314: 1298-1303.

318. Stenflo J. Structure and function of protein C. Semin Thromb Hemostasis 1984; 10: 109-121.

319. Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. J Biol Chem 1981; 256: 11128-11131.

320. Schafer AI. The hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1985; 102: 814-828.

321. Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Eng J Med* 1984; 311: 1525-1528.

322. Comp PC, DeBault LE, Esmon NL, Esmon CT. Human thrombomodulin is inhibited by IgG from two patients with non-specific anticoagulants. *Blood* 1983; 62 (5) Sup 1: 299 a (Abstr).

323. Cariou R, Tobelem G, Caen J. L'anticoagulant circulant de type lupus, facteur de risque thrombotique par inhibition de l'activation de la protéine C. *C R Acad Sci Ser III-Vie* 1986; 303: 113-118.

324. Freyssinet MT, Gauchy J, Cazenave JP. The effect of phospholipids on the activation of protein C by the human thrombin-thrombomodulin complex. *Biochem J* 1986; 238: 151-157.

325. Galvin JB, Kurosawa S, Moore K, Esmon CT, Esmon NL. Reconstitution of rabbit thrombomodulin into phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1987; 262: 2199-2205.

326. Freyssinet JM, Wiesel ML, Gauchy J, Boneu B, Cazenave JP. An IgM lupus anticoagulant that neutralizes the enhancing effect of phospholipid on purified endothelial thrombomodulin activity. A mechanism for thrombosis. *Thromb Haemostas* 1986; 55: 309-313.

327. Friedman KD, Marlar RA, Gill JC, Endres-Brooks J, Montgomery RR. Protein S deficiency in patients with the lupus anticoagulant. *Blood* 1986; 68(5). Sup 1: 333 (Abstr).

328. Maruyama I, Majerus PW. The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A549 cancer cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 15432-15438.

329. Sakata Y, Curriden S, Lawrence D, Griffin JH, Loskutoff DJ. Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases anti-activator activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1121-1125.

330. Van Hinsberg VWM, Bertina RM, Van Wijngaarden A, Van Tilburg NH, Emeis JJ, Haverkate F. Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood* 1985; 65: 444-451.

331. Elias M, Eldor A. Thromboembolism in patients with the "lupus"-like circulating anticoagulant. *Arch Intern Med* 1984; 144: 510-515.

332. Bowie WEJ, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Clin Invest* 1963; 62: 416-430.

333. Williams H, Laurent R, Gibson T. The lupus coagulation inhibitor and venous thrombosis: A report of four cases. *Clin Lab Haematol* 1980; 2: 139-144.

334. Carreras LO, Vermylen JG. "Lupus" anticoagulant and thrombosis - possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Haemostas (Stuttgart)* 1982; 48: 38-40.

335. Ordi J, Vilardell M, Barquinero J, Selva A, Alijotas J, Bosch J. Fenómenos trombóticos y anticoagulante lúpico en una

serie de 112 enfermos con lupus eritematoso sistémico. Rev Clin Esp 1987; 180: 66-70.

336. Johanson EA, Niemi KM, Mustakallio KK. A peripheral vascular syndrome overlapping with systemic lupus erythematosus: Recurrent venous thrombosis and hemorrhagic capillary proliferation with circulating anticoagulants and false-positive seroreactions for syphilis. Dermatologica 1977; 155: 257-267.

337. Harris EN, Gharavi AE, Asherson RA, Boey ML, Hughes GRV. Cerebral infarction in systemic lupus: Association with anticardiolipin antibodies. Clin Exp Rheum 1984; 1: 47-51.

338. Asherson RA, Mackworth-Toung CG, Boey ML, Hull RG, Saunders AE, Gharavi AE, Hughes GRV. Pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus. Br Med J 1983; 287: 1024-1025.

339. Asherson RA, Morgan SH, Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV, Millar AB. Pulmonary hypertension and chronic cutaneous lupus erythematosus: association with the lupus anticoagulant. Arthr Rheumatol 1985; 28: 118.

340. Hainaut P, Lavenne E, Magy JM, Lebacqz EG. Circulating lupus-type anticoagulant and pulmonary hypertension associated with mixed connective tissue disease. Clin Rheumatol 1986; 5: 96.

341. Jaffe WH, Wattie WJ, Rutland MD, Lubbe WF. Extensive pulmonary embolism associated with the lupus anticoagulant. N Zeal Med J 1985; 98: 184.

342. Anderson NE, Ali MR. The lupus anticoagulant, pulmonary thromboembolism, and fatal pulmonary hypertension. Ann Rheum Dis 1984; 43: 760.

343. Asherson RA, Oakley CM. Pulmonary hypertension and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1986; 13: 1-5.

344. Asherson RA, Harris EN, Bernstein RM, Mackworth-Young CG, Hughes GRV. Immunological studies in "primary" idiopathic pulmonary hypertension. *Eur J Rheumatol Inflamm* 1984; 7: 75.

345. Asherson RA, Lanham JG, Mull RG, Boey ML, Gharavi AE, Hughes GRV. Renal vein thrombosis in systemic lupus erythematosus; association with the "lupus anticoagulant". *Clin Exp Rheumatol* 1984; 2: 75.

346. Hughes GRV, Mackworth-Young CG, Harris EN, Gharavi AE. Veno-occlusive disease in systemic lupus erythematosus: possible association with anticardiolipin antibodies. *Arthr Rheumatol* 1984; 27: 1071.

347. Averbuch M, Levo Y. Budd-Chiari syndrome as the major thrombotic complication of systemic lupus erythematosus with the lupus anticoagulant. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 435-437.

348. Hall S, Buettner H, Luthra HS. Occlusive retinal vascular disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1984; 11: 846.

349. Hamsten A, Norberg R, Björkholm M, DeFaire V, Holm G. Antibodies to cardiolipin in young survivors of myocardial infarction: An association with recurrent cardiovascular events. *Lancet* 1986; 1: 113-115.

350. Asherson RA, Mercey D, Phillips G, Sheenan N, Gharavi AE, Harris EN, Hughews GRV. Recurrent stroke and multi-infarct dementia in systemic lupus erythematosus: association with antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 605-611.

351. Asherson RA, Harris EN, Gharavi AE, Derkssen RHWM, Kater L, Lendrum R, Bird G, Hughes GRV. Aortic arch syndrome associated with anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Arthr Rheumat* 1985; 28: S94.

352. Grob JJ, Bonerandi JJ. Cutaneous manifestations associated with the presence of the lupus anticoagulant. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 211-219.

353. Asherson RA, Morgan SH, Harris EN, Gharavi AE, Kraus T, Hughes GRV. Arterial occlusion causing large bowel infarction - a reflection of clotting diathesis in SLE. *Clin Rheumatol* 1986; 5 (1): 102.

354. Derue GJ, Englert HJ, Harris EN, Gharavi AE, Morgan SH, Hull RG, Elder MG, Hawkins DF, Hughes GRV. Fetal loss in systemic lupus: association with anticardiolipin antibodies. *Br J Obst Gynaecol* 1985; 5: 207.

355. Nilsson IM, Astedt B, Hedner V, Berezin D. Intrauterine death and circulating anticoagulant ("anti-thromboplastin"). *Acta Med Scand* 1985; 197: 153-159.

356. Firkin BG, Howard MA, Radford N. Possible relationship between lupus inhibitor and recurrent abortion in young women. *Lancet* 1980; 2: 366.

357. Soulier RP, Boffa MC. Avortements à répétition, thromboses et anticoagulant circulant antithromboplastine. *Nouv Presse Med* 1980; 9: 859-864.

358. Valesin G, Carsetti R, Patricelli S, Conti L, Grandolfo GM, Nicolla M. Autoimmunity and abortion. A: Shulman S, Dondero F,

Nicotra M, ed. Serono Symposium No 45. Immunological factors in human reproduction. Academic Press, Londres, Nova York. 1982.

359. Lubbe WF, Palmer SJ, Butler WS, Laggins GC. Fetal survival after prednisone suppression of maternal lupus anticoagulant. *Lancet* 1983; 1: 1361-1363.

360. Ordi J. Comunicació al II Congrés Català de Medicina Interna. Barcelona, 1988.

361. Hull RG, Harris EN, Morgan SH, Hughes GRV. Anti-Ro antibodies and abortions in women with SLE. *Lancet* 1983; 2: 1138.

362. Prentice RL, Gatenby PA, Loblay RH, Shearman RP, Kronenberg H, Basten A. Lupus anticoagulant in pregnancy. *Lancet* 1984; 1: 464.

363. Harris EN, Asherson RA, Gharavi AE, Morgan SH, Derve G, Hughes GRV. Thrombocytopenia in SLE and related autoimmune disorders: Association with anticardiolipin antibody. *Br J Haematol* 1985; 59: 227-230.

364. Harris EN, Gharavi AE, Hedge V, Morgan SM, Derve G, Englert H, Chan JKH, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1985; 59: 1-6.

365. Fulford KW, Catterall RD, Delhanty JJ, Donjach V, Kremer M. A collagen disorder of the nervous system presenting as multiple sclerosis. *Brain* 1972; 95: 373-386.

366. Wilson WA, Hughes GRV. Aetiology of Jamaican neuropathy. *Lancet* 1975; 1: 240.

367. Levine SR, Welch KMA. The spectrum of neurologic disease

associated with antiphospholipid antibodies. Arch Neurol 1987; 44: 875-883.

368. Bresnihan B, Oliver M, Grigor G, Hughes GRV. Brain reactivity of lymphocytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus with and without cerebral involvement. Clin Exp Immunol 1977; 30: 333-337.

369. Bluestein HG. Neurocytotoxic antibodies in serum of patients with systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 3965-3969.

370. Wilson HA, Winfield JB, Lahita RG, Koffler D. The association of IgG anti-brain antibodies with central nervous system dysfunction and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1979; 12: 458-462.

371. Zvaifler NJ, Bluestein HG. The pathogenesis of central nervous system manifestations of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 862-866.

372. Hirano T, Hashimoto H, Shiokawa Y, Iwamura M, Nagai Y, Kasai M, Ochiari K. Antiglycolipid autoantibody detected in the sera from systemic lupus erythematosus patients. J Clin Invest 1980; 66: 1437-1440.

373. Guarnieri M. Reaction of anti-phosphatidylinositol antisera with phospholipids antigens. Lipids 1974; 9: 692-695.

374. Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, Rabinsohn Y, Shapiro D. Sphingomyelin specific antibodies elicited by synthetic conjugates. Immunochemistry 1973; 10: 736-743.

375. Hughes GRV. The Prosser-White Oration- 1983. Connective tissue disease and the skin. Clin Exp Dermatol 1984; 9: 535.

376. Jonas J, Kölble K, Völcker HE, Kalden JR. Central retinal artery occlusion in Sneddon's disease associated with antiphospholipid antibodies. *Am J Ophtal* 1986; 102: 37.

377. Chartash EK, Paget SA, Lockshin MD. Lupus anticoagulant associated with aortic and mitral valve insufficiency. *Arthritis Rheum* 1986; 29: S95.

378. Joaquin J, Pennec Y, Mottier R, Youinou P, Cledes J, Leroy JP; Le Menn G. Accelerated hypertension associated with lupus anticoagulant and false positive VDRL in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 147.

379. Gleicher N, El-Roeiy A, Confino E, Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease. *Obstet Gynecol* 1987; 70:115-121.

380. Ware-Branch D, Kochenour NK, Rote NS, Scott JR. Postpartum syndrome associated with antiphospholipid antibodies. *Proceeding on 2nd Internacional Symposium on anticardiolipin antibodies.* 1986.

381. Landi G, Calloni MV, Sabbadini MG. Recurrent ischemic attacks in young adults with lupus anticoagulant. *Stroke* 1983; 14: 377-379.

382. Gladman DD, Urowitz MB, Tozman EC, Glynn MX. Haemostatic abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1983; 207: 424-433.

383. Ordi J, Vilardell M, Vila M, Joven J, Tornos J. Prednisone and maternal lupus anticoagulant. *Lancet* 1983; 2: 576.

384. Asherson RA, Chan JKH, Harris EN, Gharavi AE, Hughes

GRV. Anticardiolipin antibody, recurrent thrombosis, and warfarin withdrawal. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 823-825.

385. Lechner K, Pabinder-Faschingl. Lupus anticoagulants and thrombosis. *Haemostasis* 1985; 15: 254-262.

386. Glueck HI, Kant KS, Weiss MA, Pollack VE, Miller MA, Coots M. Thrombosis in systemic lupus erythematosus. Relation to the presence of circulating anticoagulants. *Arch Intern Med* 1985; 145: 1389-1395.

387. Harris EN, Chan JHK, Asherson RA, Aber VR, Gharavi AE, Hughes GRV. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med* 1986; 146:2153-2156.

388. Asherson RA, Derksen R, Harris EN, Bingley PJ, Hoffbrand BI, Gharavi AE, Kater L, Hughes GRV. Large vessel occlusion and gangrene in systemic lupus erythematosus and "lupus-like" disease. A report of six cases. *J Rheumatol* 1986; 13: 740-747.

389. Kaufman JL, Bancilla E, Slade J. Lupus vasculitis with tibial artery thrombosis and gangrene. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1291-1292.

390. Asherson RA, Harris EN, Gharavi A, Hughes GRV. Myocardial infarction in systemic lupus erythematosus and "lupus-like" disease. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1292-1293.

391. Bruneau C, Intrator L, Sobel A, Beaumont V, Billecocq A. Antibodies to cardiolipin and vascular complications in women taking oral contraceptives. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1294.

392. Derksen RHW, Biesma D, Bouma BN, Gmeling Meyling FHJ, Kater L. Discordant effects of prednisone on anticardiolipin

antibodies and the lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1295.

393. Dodd HJ, Sarkany I, O'Shaughnessy D. Widespread cutaneous necrosis associated with the lupus anticoagulant. *Clin Exp Dermatol* 1985; 10: 581-586.

394. Editorial. Anticardiolipin antibodies: a risk factor for venous and arterial thrombosis. *Lancet* 1985; 1: 912-913.

395. Hirsh J. The optimal antithrombotic dose of aspirin. *Arch Intern Med* 1985; 145: 1582.

396. Castañeda S, Herrero-Beaumont G, Tornero J, Aguado JM, Outeiriño J. Anticoagulante lúpico: un marcador en expansión. *Rev Clin Esp* 1985; 177: 1-6.

397. Portugal-Alvarez J. Anticoagulante lúpico. Una perspectiva fisiopatológica, clínica y terapéutica. *An Med Intern* 1986; 3: 101-102.

398. Barquinero J, Ordi J. Anticuerpos antifosfolípido. *Med Clin (Barc)* 1987; 88: 455-458.

399. Ordi J, Vilardell M. El anticoagulante lúpico. *Med Clin (Barc)* 1983; 81: 178-181.

400. McLucas E, Harrison RL. The lupus anticoagulant. *J Med Technol* 1986; 3: 440-442.

401. Petri M, Rheinschmidt M, Whiting-O'Keefe W, Hellmann D, Corash L. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1987; 106: 524-531.

402. Ming CH. Anticardiolipin antibody quantitation. *Ann Intern Med* 1987; 107: 941-942.

403. Petri M, Golbus M, Anderson R, Whiting-O'Keefe W, Corash L, Hellmann D. Antinuclear antibody, lupus anticoagulant, and anticardiolipin antibody in women with idiopathic habitual abortion. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 601-606.

404. Fort JG, Susan Cowchock F, Abruzzo JL, Bruce Smith J. Anticardiolipin antibodies in patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 752-760.

405. Ordi J, Barquinero J. L'anticoagulant lúpic. *Ann Med (Barc)* 1987; 73: 165-167.

406. Lockshin MD. Anticardiolipin antibody. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 471-472.

407. Lockshin MD, Gharavi AE. Anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med* 1987; 107: 431-432.

408. Petri M, Whiting-O'Keefe Q, Hellmann D, Corash L. Anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med* 1987; 107: 432.

409. Harris EN, Baguley G, Asherson R, Khamashta M, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med* 1987; 107: 432-433.

410. Manoharan A, Gottlieb P. Bleeding in patients with lupus anticoagulant. *Lancet* 1984; 2: 171.

411. Ordi J, Vilardell M, Oristrell J, Valdés M, Knobel A, Alijotas J, Monasterio Y, Flores P. Bleeding in patients with lupus anticoagulant. *Lancet* 1984; 2: 868-869.

412. Simel DL, StClair EW, Adams J, Greenberg CS. Correction of hypoprothrombinemia by immunosuppressive treatment of the lupus

anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome. *Am J Med* 1987; 83: 563-566.

413. Fisher M, McGehee W. Cerebral infarct, TIA, and lupus inhibitor. *Neurology* 1986; 36: 1234-1237.

414. Brandt K, Lessell S. Migrainous phenomena in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 7-16.

415. Norberg R, Ernerudh J, Hamsten A, Unander AM, Arfors I. Phospholipid antibodies in cardiovascular disease. *Acta Med Scand* 1987; Suppl 715: 93-98.

416. Levine SR, Welch KMA. Cerebrovascular ischemia associated with lupus anticoagulant. *Stroke* 1987; 18: 257-263.

417. Baker WH, Potthoff WP, Biller J, McCoyd K. Carotid artery thrombosis associated with lupus anticoagulant. *Surgery* 1985; 98: 612-615.

418. Greenspoon J. Cerebral infarction, lupus anticoagulant, and habitual abortion. *JAMA* 1986; 255: 2164.

419. Bouchez B, Arnott G, Hatron PY, Wattel A, Devulder B. Chorée et lupus érythémateux disséminé avec anticoagulant circulant. Trois cas. *Rev Neurol (Paris)* 1985; 141: 571-577.

420. Harris EN, Gharavi AE, Mackworth-Young CG, Patel BM, Derue G, Hughes GRV. Lupoid sclerosis: a possible pathogenetic role for antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 281-283.

421. Morton KE, Gavaghan TP, Krilis SA, Daggard GE, Baron DW, Hickie JB, Chesterman CN. Coronary artery bypass graft failure. An autoimmune phenomenon? *Lancet* 1986; 2: 1353-1356.

422. Asherson RA, Mackay IR, Harris EN. Myocardial infarction in a young man with systemic lupus erythematosus, deep vein thrombosis, and antibodies to phospholipid. *Br Heart J* 1986; 56: 190-193.

423. Malinow AM, Rickford WJK, Mokriski BLK, Saller DN, McGuinn WJ. Lupus anticoagulant. Implications for obstetric anaesthetists. *Anaesthesia* 1987; 42: 1291-1293.

424. Babikian VL, Levine JD. Lupus anticoagulant and cerebral infarction: therapeutic implications. *J Neurol* 1987; 234: 361-362.

425. Ingram SB, Goodnight SH Jr, Bennett RM. An unusual syndrome of devastating noninflammatory vasculopathy associated with anticardiolipin antibodies: Report of two cases. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1167-1172.

426. Druzin ML, Lockshin M, Edersheim TG, Hutson JM, Krauss AL, Kogut E. Second-trimester fetal monitoring and preterm delivery in pregnancies with systemic lupus erythematosus and/or circulating anticoagulant. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 1503-1510.

427. Harris EN. International Symposium on anticardiolipin antibodies. Jamaica, 1987.

428. Font J, Cervera R, Casals Fj, Bové A, Guerrero A, López-Soto A, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. Estudio de la relación de los anticuerpos antifosfolípidos con los fenómenos trombóticos y la actividad del lupus eritematoso sistémico. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 490-493.

429. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590.

430. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. N Eng J Med 1975; 292: 344-403.

431. Blumberg B, Bunim JJ, Calkins E, Pirani CL, Zvaifler NJ. ARA nomenclature and classification of arthritis and rheumatism (tentative). Arthritis Rheum 1964; 7: 93-97.

432. Goodman BW Jr. Arteritis temporal. Am J Med (ed. esp.) 1979; 10: 359-373.

433. Hutson KA, Hunder GG, Lie JT et al. Temporal arteritis: A 25 year epidemiologic, clinical and pathologic study. Am Intern Med 1978; 80: 162-170.

434. Christensen E, Crowe J, Doniach D et al. Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients. Gastroenterology 1980; 78: 236-249.

435. Rodés J, Parés A, Bruguera M. Cirrosis biliar primaria: una enfermedad multisistémica. Patogenia y tratamiento. Gastroenterol Hepatol 1984; 7: 448-459.

436. Burns TR, Saleem A. Idiopathic thrombocytopenic purpura. Am J Med 1985; 75: 1001-1007.

437. Font J, Casals FJ, Cervera R, Bové A, López-Soto A, Guerrero A, Ingelmo M. Sensibilidad de las diferentes pruebas de laboratorio en la detección del anticoagulante lúpico. Biol Clin Hematol 1988 (en prensa).

438. Wold RT, Young FE, Tan EM, Farr ERS. Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid. Science 1968; 161: 806-807.

439. Johnson AM. Immuno-electrophoresis. A: Rose NR, Friedman H, Fahey JL ed. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. American Society for Microbiology. Washington, 1986: 20-21.
440. Johnson AM. Double immunodiffusion. A: Rose NR, Friedman H, Fahey JL ed. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. American Society for Microbiology. Washington, 1986: 16-17.
441. Swanson J, Beck MB. Variations in the morphological patterns of autoimmune nuclear fluorescence. Lancet 1961; 1: 1203-1205.
442. Griner PF, Mayewsk RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. Ann Intern Med 1981; 94: 557-567.
443. Gottfried EL, Wagar EA. Laboratory testing: a practical guide. Disease Month 1983.
444. Spiegel MR. Theory and problems on statistics. McGraw Hill Inc. Nova York 1961: 1-357.
445. Domènech JL. Bioestadística: Métodos estadísticos para investigadores. Ed Herder. Barcelona 1980: 1-642.
446. Diem K, Lentner C. Documenta Geigy: Tablas científicas. Ciba-Geigy, Basilea 1975: 9-200.
447. Cobo E. El análisis de tablas de contingencia. Ed. Universitat de Barcelona. 1986: 19.
448. Jennrich R, Sampson P. Stepwise discriminant analysis. A: Dixon WJ ed. BMDP statistical software manual. University of California Press. Berkeley, 1985: 519-537.
449. Porta M, Plasencia A, Sanz F. La calidad de la

información clínica (y III): ¿estadísticamente significativo o clínicamente importante? Med Clin (Barc) 1988; 90: 463-468.

450. Cabré J, Pedreira JD, Esteban R, Martín C, Martínez Vázquez JM. Manifestaciones clínicas, biológicas y evolutivas del LES. Med Clin (Barc) 1977; 68: 223-228.

451. Wallace DJ, Podell T, Weiner J et al. Systemic lupus erythematosus. Survival patterns. Experience with 609 patients. JAMA 1981; 245: 934-938.

452. Torras A, Vallés M, Darnell A, Mirapeix E, Revert L. Nefropatía lúpica: manifestaciones clínicas y morfológicas. Med Clin (Barc) 1980; 75: 1-9.

453. Villar J, Sánchez J, Pachón J et al. Lupus eritematoso sistémico. Valoración de las manifestaciones clínicas y biológicas en 54 casos. Rev Clin Esp 1980; 159: 21-26.

454. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GRV. Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 april 1986. Clin Exp Immunol 1987; 68: 215-222.

455. Harris EN, Hughes GRV. Standardising the anticardiolipin antibody test. Lancet 1987; 1: 277.

456. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV. Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization. Arthritis Rheum 1987; 30: 835-837.

457. Meroni PL, Harris EN, Brucato A, Tincani A, Barcellini W, Vismara A, Balestrieri G, Hughes GRV, Zanussi C. Anti-mitochondrial type M5 and anti-cardiolipin antibodies in autoimmune disorders: studies on their association and cross-reactivity. Clin Exp Immunol 1987; 67: 484-491.

458. Cohen AJ, Phis TM, Kressler CM. Circulating coagulation inhibitors in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104: 175-180.

459. Font J, Cervera R. Síndrome antifosfolípido primario: ¿una nueva entidad? *Med Clin (Barc)* 1988 (en prensa).

460. Sturfelt G, Nived O, Norberg R, Thorstensson R, Krook K. Anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 382-388.

461. Meyer O, Piette JC, Bourgeois P, Fallas P, Bletry O, Jungers P, Kahn MF, Godeau P, Ryckewaert A. Antiphospholipid antibodies: a disease marker in 25 patients with antinuclear antibody negative systemic lupus erythematosus (SLE). Comparison with a group of 91 patients with antinuclear antibody positive SLE. *J Rheumatol* 1987; 14: 502-506.

462. Font J, Cervera R, Pallarés L, Bové A, Herrero C, Sentís J, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. Estudio de 150 casos de lupus eritematoso sistémico (LES): Análisis de las características clinico-inmunológicas y de los distintos subgrupos clínicos. *An Med Intern (Madrid)* 1986; (supl. III): 48.

463. Colação CB, Male DK. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 449-456.

464. Triplett DA, Brandt JT, Musgrave KA, Orr CA. The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid. *JAMA* 1988; 259: 550-554.

465. Bessman JD. Epitopes in Medicine: the example of the lupus anticoagulant. *JAMA* 1988; 259: 573.

466. Kelsey PR, Stevenson JK, Poller J. The diagnosis of lupus anticoagulants by the activated partial thromboplastin time. The central role of phosphatidylserine. *Thromb Haemostas* 1984; 52: 172-175.

467. Alving BM, Baldwin PE, Richards RL, Jackson BJ. The dilute phospholipid APTT: A sensitive assay for verification of lupus anticoagulants. *Thromb Haemostas* 1985; 54: 709-712.

468. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986; 68: 869-874.

469. Font J, Casals FJ, Cervera R, Bové A, López-Soto A, Guerrero A, Ingelmo M. Sensibilidad de las diferentes pruebas de laboratorio en la detección del anticoagulante lúpico. *Biol Clin Hematol* 1988 (en prensa).

470. Branch DW, Rote NS, Scott JR. The demonstration of lupus anticoagulant by an enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA). *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 39: 298-307.

471. Nagata N, Muso E, Sekita K, Hamashima Y. STS-reactive IgG antibodies and anti-dsDNA antibodies in the sera from patients with systemic lupus erythematosus. *IRCS Med Sci* 1985; 13: 1120-1121.

472. Colaço CB, Scadding G, Lockhard S. Anti-cardiolipin antibodies in neurological disorders: cross-reaction with anti-single stranded DNA activity. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 313-319.

473. Smeenk RJT, Lucassen WAM, Swaak TJG. Is anticardiolipin activity a cross-reaction of anti-DNA or a separate entity? *Arthritis Rheum* 1987; 30: 607-617.

474. Rauch J, Tannenbaum H, Senécal JL, Janoff AS, Cullis PR, Frojmovic MM. Polyfunctional properties of hybridoma lupus anticoagulant antibodies. *J Rheumatol* 1987; (supl. 13) 14: 132-137.

475. Rauch J, Tannenbaum M, Tannenbaum H, Ramelson H, Cullis PR, Tilcock CPS, Hope MJ, Janoff AS. Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems. *J Biol Chem* 1986; 261: 9672-9677.

476. Alarcón-Segovia D. Mecanismos patogénicos en el desarrollo de vasculitis. II Congrés Català de Medicina Interna. Barcelona, 1988.

477. Rustan NHA, Bull HA, Dowd PH, Isenberg DA, Snaith ML, Machin SJ. Presence of the lupus anticoagulant in patients with systemic lupus erythematosus does not cause inhibition of prostacyclin production. *Thromb Haemostas* 1987; 58: 390.

478. Cariou R, Tobelem G, Bellucci S, Soria J, Soric C, McLouf J, Caen J. Effect of lupus anticoagulant on antithrombotic propeerties of endothelial cells. Inhibition of thrombomodulin dependent protein C activation. *J Clin Invest* (en premsa).

479. Smolen JS. Vascular manifestations. A: Smolen JS, Zielinski CC. Systemic lupus erythematosus. Clinical and experimetal aspects. Springer-Verlag, Londres, 1987: 173.

480. Tsokos GC, Tsokos M, Riche NGH, Klippel J. A clinical and pathologic study of cerebrovascular disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1986; 16: 70-78.

481. Canavese C, Stratta P, Salomone P, Piassa GC, Vercellone A. Platelet activation in nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 1982; 17: 268-269.

482. Jarret MP, Grayzel AL, Barland P, Sussman I. Acquired antithrombin III deficiency and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1981; 40: 211.

483. Wolf PA. Risk factors for stroke. *Stroke* 1985; 16: 359-360.

484. Montalbán J, Ordi J, Barquinero J, Dávalos A, Alijotas J, Codina A, Vilardell M. Anticoagulante lúpico y accidente vascular cerebral. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 280-282.

485. Ordi J, Vilardell M, Barquinero J, Bosch J, Rodrigo MJ, Monasterio Y. Complicaciones obstétricas y trombóticas en mujeres afectas de anticoagulante lúpico. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 11-13.

486. Pritchard JA, MacDonald PC. Aborto. A: Williams' *Obstetricia*. Salvat Ed. Barcelona 1979: 474-505.

487. Harris EN. Anti-phospholipid antibodies. III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Palma de Mallorca, 1987.

488. Alving BA, Banerji B, Fogler WE, Alving CR. Lupus anticoagulant activities of murine monoclonal antibodies to liposomal phosphatidylinositol phosphate. *Clin Exp Immunol* 1987; 69: 403-408.

489. Finazzi G, Cortelazzo S, Viero P, Barbui T. IgM gammopathy and the lupus anticoagulant syndrome in habitual aborters. *JAMA* 1986; 255: 39.

490. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood* 1987; 70: 69-76.

491. Branch DW, Rote NS, Dostal DA, Scott JR. Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 42: 63-75.

492. Font J, Casals FJ, Cervera R, Bové A. Anticuerpos anticardiolipina y trombosis en el lupus eritematoso sistémico. *Med Clin (Barc)* 1987; 89: 41.

493. Font J, Cervera R, Bové A, Casals FJ. Anticuerpos antifosfolipido como marcador del lupus eritematoso sistémico. *Med Clin (Barc)* 1987; 89: 528.

494. Casals FJ, Font J, Cervera R, Bové A, Guerrero A, Alfonso L, Alonso A, Medina L. El síndrome de los anticuerpos antifosfolípidos. *Lab 2000* 1987; 10: 5-11.

495. Font J, Cervera R, Casals FJ, Bové A, Guerrero A, López-Soto A, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. Estudio de la relación de los anticuerpos antifosfolípidos con los fenómenos trombóticos y la actividad clínica del lupus eritematoso sistémico. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 490-493.

496. Cervera R, Bové A, López-Soto A, Casals FJ. Síndrome lúpico inducido por fármacos y anticuerpos antifosfolípidos. *Rev Esp Reumatol* 1988; 15: 71-72.

497. Khamashta MA, Gil A, Lavilla P, Valencia ME, Pintado V, Vázquez JJ. Manifestaciones trombóticas y anticoagulante lúpico. *Rev Clin Esp* 1988; 182: 286.

498. Ordi J, Vilardell M, Barquinero J. Manifestaciones trombóticas y anticoagulante lúpico. Rev Clin Esp 1988; 182: 286-287.

499. Casals FJ, Font J, Cervera R, Bové A, Guerrero A, Ingelmo M. Relación del anticoagulante lúpico con los anticuerpos anticardiolipina. Biol Clin Hematol 1987; 9 (supl. 2): 98.

500. Cervera R, Font J, Casals Fj, Bové A, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. Interés de los anticuerpos antifosfolípidos en el lupus eritematoso sistémico. Biol Clin Hematol 1987; 9 (supl 2): 99.

501. Cervera R, Font J, Casals FJ, Bové A, López-Soto A, Guerrero A, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. Relació dels anticossos antifosfolípids amb els fenòmens trombòtics i l'activitat clínica del LES. Ann Med (Barc) 1988; 74: 58.

502. Cervera R, Cid M, Font J, Casals FJ, López-Soto A, Ingelmo M. Incidència dels anticossos anticardiolipina a l'arteritis de Horton. Ann Med (Barc) 1988; 74: 58.

503. Sontheimer RD. The anticardiolipin syndrome. A new way to slice an old pie, or a new pie to slice? Arch Dermatol 1987; 123: 590-595.

504. Weinstein C, Miller MH, Axtens R, et al. Livkdo reticularis associated with increased titers of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. Arch Dermatol 1987; 123: 596-600.

505. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. J Rheumatol 1986; 13: 486-489.

506. Manoussakis MN, Gharavi AE, Drosos AA, Kitridou RC, Moutsopoulos HM. Anticardiolipin antibodies in unselected autoimmune rheumatic disease patients. Clin Immunol Immunopathol 1987; 44: 297-307.

X. INDEX DE TABLES I FIGURES

Tabla 1	27
Tabla 2	57
Tabla 3	90
Tabla 4	110
Tabla 5	122
Tabla 6	131
Tabla 7	132
Tabla 8	133
Tabla 9	134
Tabla 10	135
Tabla 11	138
Tabla 12	138
Tabla 13	138
Tabla 14	140
Tabla 15	140
Tabla 16	140
Tabla 17	142
Tabla 18	146
Tabla 19	149
Tabla 20	151
Tabla 21	155
Tabla 22	157
Tabla 23	160
Tabla 24	161
Tabla 25	164

Tabla 26	166
Tabla 27	168
Tabla 28	174
Tabla 29	176

Figura 1	35
Figura 2	52
Figura 3	66
Figura 4	100
Figura 5	121
Figura 6	128
Figura 7	130
Figura 8	143
Figura 9	145
Figura 10	147
Figura 11	150
Figura 12	152
Figura 13	154
Figura 14	156
Figura 15	158
Figura 16	162
Figura 17	165
Figura 18	167

Figura 19	170
Figura 20	171
Figura 21	173
Figura 22	177
Figura 23	178
Figura 24	180
Figura 25	181
Figura 26	209
Figura 27	211